

**MODULARISIERUNG VON GLYKOSYLTRANSFERASEN UND UNTERSUCHUNGEN ZUM
AKTIVITÄTSNACHWEIS IM HOCHDURCHSATZVERFAHREN**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Malte Gumz, geb. Büttner

aus Hamburg

1. Referentin oder Referent:

Frau Prof. Dr. U. Wittstock

2. Referentin oder Referent:

Herr Prof. Dr. L. Beerhues

eingereicht am:

07.03.2016

mündliche Prüfung (Disputation) am:

01.07.2016

Druckjahr 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Büttner, M., Barleben, L., One-pot fusion polymerase chain reaction for combinatorial synthesis of DNA from several cassettes, Analytical Biochemistry. 2012 Feb 15; 421(2):797-8

Die Qualität eines Forschers misst sich nicht an der Zahl der Antworten,
die er gibt, sondern an der Qualität der Fragen, die er stellt.

Aba Assa

EIN DANKESCHÖN

Frau Prof. Dr. U. Wittstock möchte ich für die Übernahme des 1. Gutachtens danken und dafür, dass sie mir all' ihre Unterstützung hat zukommen lassen, um meine Promotion am IPB erfolgreich und mit Freude abschließen zu können.

Herrn Prof. Dr. L. Beerhues möchte ich meinen Dank für die Bereitschaft, sich der Arbeit als 2. Gutachter anzunehmen, zukommen lassen. Herrn Prof. Dr. R. Hänsch danke ich für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. L. Barleben danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Dr. Einar J. Stauber möchte ich meinen Dank für sein Engagement, mir mit Rat und Tat während der Analytik zur Seite zu stehen, aussprechen. Dr. H.-M. Schiebel (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig) danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung massenspektrometrischer Daten.

Den „Freunden des Teekurses“, im Besonderen Dr. Luise Cramer, Dr. Andreas Müller und Nico Langer möchte ich für eine schöne und vergnügliche Zeit danken.

Den Doktoranden und Freunden, die ich am IPB kennenlernen durfte, möchte ich für viele angenehme Stunden am Institut und in unserer gemeinsamen Freizeit danken. Besonders erwähnt seien hier Dr. René Müller, Dr. Jennifer-Christin Kuchernig, Dr. Maike van Ohlen, Dr. Marion Wiggermann und Tobias Fiesel.

Allen tatkräftigen Mitarbeitern des IPB, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen gilt mein herzlicher Dank - allen voran Anita Backenköhler und Horst, die zu guten Freunden geworden sind. Natürlich möchte ich mich auch bei Kathrin Meier und Loretta Heise für ihre helfenden Hände bedanken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Mama, meiner „großen“ kleinen Schwester Neele und meinem „Lieblings-Schwager“ Christian aussprechen - besonders für deren Zuversicht und Unterstützung auf meinem Weg.

Frauke, Dir danke ich für deine immerwährende und unermüdliche Geduld, Übersicht und Unterstützung, ohne die ich hoffnungslos verloren gewesen wäre...

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Glykosylierung	1
1.2 Glykosyltransferasen	2
1.2.1 Aktivität, Spezifität und Lokalisation	2
1.2.2 Klassifizierung der Glykosyltransferasen	3
1.2.2.1 Strukturelle Superfamilien	3
1.2.2.2 Stereospezifische Einteilung.....	7
1.3 Enzym-Engineering mit Glykosyltransferasen	10
1.3.1 Austausch einzelner Aminosäuren	10
1.3.2 Erzeugung chimärer Glykosyltransferasen	11
1.3.3 Strategien zur Herstellung chimärer Glykosyltransferasen	15
1.4 Hydrochinon-Glucosyltransferase und Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase	17
1.4.1 Hydrochinon-Glucosyltransferase	17
1.4.2 Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase	18
1.5 Nachweisverfahren für Glykosyltransferasen	19
1.6 Zielstellung.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	22
2.1.2 Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.1.3 Indikatorlösungen	23
2.1.4 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	23
2.2 Standardmethoden	26
2.2.1 Agarosegelelektrophorese	26
2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Reinigung	26
2.2.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.2.4 Quantifizierung von Plasmid-DNA	27
2.2.5 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.6 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28

2.2.7	Herstellung von Dauerkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterienstämmen	29
2.2.8	PCR	29
2.2.9	Restriktion von DNA-Amplifikaten	30
2.2.10	Restriktion und Dephosphorylierung des Vektors pET15b	31
2.2.11	Ligation	31
2.2.12	Analytischer Restriktionsverdau	32
2.2.13	DNA Sequenzierung	32
2.2.14	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.15	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test	33
2.3	Herstellung von Expressionskonstrukten	34
2.3.1	OE-PCR	34
2.3.2	“One-pot fusion“-PCR zur Konstruktion synthetischer $AS_{x+y}GalT$ Fusionsgene	35
2.3.3	Herstellung von Expressionskonstrukten für chimäre ASGalT-cDNAs mittels ITCHY-Technik	35
2.4	Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen in Schüttelkolben	36
2.4.1	Heterologe Expression	36
2.4.2	Zellaufschluss	37
2.4.3	Affinitätschromatographische Anreinigung	38
2.5	Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen in Mikroplatten	39
2.5.1	Heterologe Expression	39
2.5.2	Zellaufschluss	39
2.6	Aktivitätsnachweis von Glykosyltransferasen	40
2.6.1	Nachweis der pH-Änderung	40
2.6.1.1	Proteinextrakt	40
2.6.1.2	Koloniescreening	40
2.6.2	Nachweis spezifischer Glykoside	41
2.6.2.1	Enzymreaktion für die His ₆ -Hydrochinon-Glucosyltransferase	41
2.6.2.2	Enzymreaktion für die His ₆ -Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase	42
2.6.2.3	Enzymreaktion von Glykosyltransferasen in Mikroplatten	42
2.6.2.4	HPLC-DAD	42
2.6.2.5	HPLC-ESI-MS/MS	43
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Heterologe Expression und Nachweis der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase	45
3.2	Heterologe Expression und Nachweis der His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase	48

3.3	Kultivierung, Extraktion und Nachweis im Mikrolitermaßstab	51
3.4	Validierung der Nachweismethoden für Glykosyltransferasen.....	54
3.4.1	Klonscreening mit <i>E. coli</i> -Kolonien durch Nachweis einer pH-Änderung.....	54
3.4.2	Klonscreening in Flüssigkulturen durch Nachweis einer pH-Änderung	58
3.4.3	Nachweis der Protonenfreisetzung als Enzymassay im Mikrolitermaßstab	60
3.4.4	Nachweis der Glykosylierung mittels HPLC-ESI-MS/MS	64
3.5	Erzeugung chimärer Glykosyltransferasen	71
3.5.1	Entwicklung der „One-pot fusion“-PCR	71
3.5.2	Anwendung der „One-pot fusion“-PCR	72
3.5.3	Zufällige Fusion mittels ITCHY-Technik	75
3.6	Aktivität chimärer Glykosyltransferasen	80
4	DISKUSSION	85
4.1	Herstellung und Nachweis aktiver His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase.....	85
4.2	Entwicklung von Aktivitätsnachweisen für Glykosyltransferasen.....	86
4.2.1	Universelle Nachweismethoden	86
4.2.2	Glykosidnachweis mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS.....	90
4.3	Konstruktion chimärer Glykosyltransferasen mit Domänen der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase	92
	ZUSAMMENFASSUNG	97
	ABSTRACT.....	99
	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	ANHANG.....	113

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

amu	„atomic mass units“
AS	Hydrochinon-Glucosyltransferase
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CAZy	„Carbohydrate Active Enzyme“
cps	„counts per second“
DAD	Diodenarray-Detektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
GalNAc	N-Acetylglucosamin
GalT	Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITCHY	„incremental truncation for the creation of hybrid enzymes“
ITL	„incremental truncation library“
LB	„lysogeny broth“
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MRM	„multiple reaction monitoring“
MS	Massenspektrometrie
NRD	„nucleotide recognition domain“
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
OE-PCR	„overlap extension“-PCR
ORF	Offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSPG	„plant secondary product GT“
R _t	Retentionszeit
RP	Reverse Phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	„super optimal broth with catabolite repression“
TB	„terrific broth“
TBE	Tris-Borat-EDTA
UDP	Uridindiphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	„visible“

1 EINLEITUNG

1.1 Glykosylierung

Kohlenhydrate sind von universeller Bedeutung für das Leben. Sie dienen in Form von Monosacchariden oder von Holosiden (Kondensationsprodukte zweier Zucker) als Energielieferanten (z. B. Glykolyse), als Quelle für lebenswichtige Grundbausteine (z. B. Pentosephosphatweg, Shikimatweg), als Speicherform für Energie (z. B. Stärke, Glykogen) oder als Gerüstsubstanz (z. B. Cellulose). In Form von Heterosiden (Kondensationsprodukte aus Zuckern mit einem Aglykon) spielen Kohlenhydrate auch eine entscheidende Rolle für zelluläre Erkennungsmechanismen (z. B. Glykokalix) und als Bestandteil von Enzymen (z. B. Glucocerebrosidase), Hormonen (z. B. Erythropoetin) und Antikörpern (zusammengefasst in [1, 2]). Ein großer Teil der pflanzlichen und bakteriellen Sekundärstoffe wird in Form von Glykosiden gespeichert bzw. sezerniert (z. B. Vakuolenfarbstoffe, Saponine, Aminoglykosidantibiotika). Struktur und Funktion der Kohlenhydrate stehen in einem engen Zusammenhang. Strukturelle Variabilität entsteht durch Variation der Monosaccharideinheiten, die Art ihrer Verknüpfung und die Anzahl und Zusammensetzung der Monomere in oligomeren und polymeren Strukturen. Das Hinzufügen oder die Veränderung von Zuckerresten kann zu einer Veränderung der biologischen Aktivität führen [3]. In verschiedenen Organismengruppen kommen unterschiedliche Monosaccharideinheiten vor (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Häufig vorkommende Monosaccharide für den Aufbau glykosylierter Verbindungen in verschiedenen Organismengruppen (zusammengefasst in [4]).

Säugetiere	Pflanzen	Bakterien
D-Fucose	D-Digitoxose	D-Oliviose
D-Galactose	D-Galactose	L-Digitoxose
D-Glucose	D-Glucose	L-Mycarose
D-Mannose	D-Xylose	L-Rhodinose
N-Acetyl-D-Glucosamin	L-Fucose	
N-Acetylneuraminsäure	L-Rhamnose	

Die Übertragung von Mono- bzw. Oligosacchariden auf Substrate wird im Allgemeinen als Glykosylierung bezeichnet und erfüllt vielfältige Funktionen. Die Glykosylierung beeinflusst die Stabilität der Metabolite sowie ihre Reaktivität und/oder Löslichkeit [5]. Der Auf- und Abbau von Kohlenhydraten und glykosylierten Verbindungen wird durch einen Bestand an Glykosyltransferasen, Glykosidasen, Glykan-Phosphorylasen und Polysaccharid-Lyasen katalysiert. Die Monosaccharid-übertragenden Glykosyltransferasen stehen im Fokus dieser Arbeit.

1.2 Glykosyltransferasen

1.2.1 Aktivität, Spezifität und Lokalisation

Für die Synthese von glykosidischen Verbindungen kommen Glykosyltransferasen (EC 2.4.) in allen Organismen vor und können in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sein. Die meisten Glykosyltransferasen kommen membran-assoziiert als periphere oder integrale Proteine vor [6 – 8]. In eukaryotischen Zellen sind die Enzyme am Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran lokalisiert [9, 10]. Daneben können Glykosyltransferasen im Cytosol oder im Zellkern lokalisiert sein [10]. Der überwiegende Teil der am Aufbau von Glykosiden beteiligten Glykosyltransferasen überträgt ein Monosaccharid unter Bildung einer einzigen glykosidischen Bindung. Als Zuckerdonor kommen vor allem Nukleosiddiphosphat-Zucker, aber auch Nukleosidmonophosphat-Zucker sowie Mono- und Diphospholipid-Zucker vor [11, 12]. Das Produkt der Glykosylierungsreaktion kann je nach Art der glykosidischen Bindung ein O-, N-, Thio- oder Selenoglykosid sein. Auch C-Glykoside können gebildet werden (Abbildung 1.1). Daneben gibt es Glykosyltransferasen, die Glykoside hydrolysieren und den Zucker dabei auf Nukleosiddiphosphate übertragen („*reverse sugar transfer*“) [13, 14] sowie iterativ arbeitende Glykosyltransferasen [15, 16].

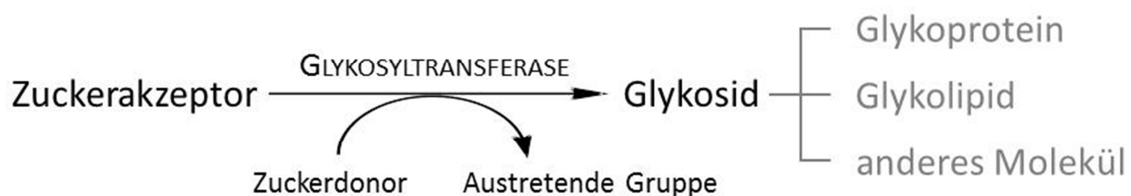


Abbildung 1.1: Reaktionsschema der Bildung von Heterosiden durch Glykosyltransferasen.

Glykosyltransferasen katalysieren die Verknüpfung diverser Akzeptormoleküle (Aglyka) mit verschiedenen aktivierten Zuckern (Zuckerdonor). Typische Zuckerakzeptoren sind Proteine, Lipide, pflanzliche und bakterielle Sekundärstoffe und diverse andere Moleküle.

Die Bildung des Glykosids durch Glykosyltransferasen erfolgt regio- und stereospezifisch. Das Aglykon wird dabei von den meisten Glykosyltransferasen auch dann noch als Substrat akzeptiert, wenn es leichte Modifikationen aufweist [17, 18]. Die CAZy-Datenbank („*Carbohydrate-Active Enzymes*“; <http://www.cazy.org>) stellt seit 1998 Informationen über Kohlenhydrat-aktive Enzyme zur Verfügung. Im September 2013 waren bereits 119.910 Sequenzen von Glykosyltransferasen hinterlegt, von denen nur 1.936, etwa 1,6 %, charakterisiert waren [19]. Mit Stand vom 19.02.2016 enthält die Datenbank 229.053 Sequenzen. Innerhalb der Datenbank werden die erfassten Glykosyltransferasen mit Hilfe ihrer Primärstruktur in 98 Familien (GT1 bis GT98) und anhand ihrer vorhergesagten Tertiärstruktur bzw.

Kristallstruktur in sogenannte strukturelle Superfamilien eingeordnet (Kapitel 1.2.2.1) [20, 21]. Nur für einen kleinen Teil der bekannten Glykosyltransferasen sind bislang Kristallstrukturen verfügbar [22, 23]. Für lediglich 139 Glykosyltransferasen aus der CAZy-Datenbank steht eine Struktur zur Verfügung [19]. Eine andere Möglichkeit der Einteilung basiert auf der Konfiguration des entstehenden Glykosids (Kapitel 1.2.2.2).

1.2.2 Klassifizierung der Glykosyltransferasen

1.2.2.1 Strukturelle Superfamilien

Auf Basis der Tertiärstruktur wurden bisher vier Superfamilien von Glykosyltransferasen beschrieben, GT-A, GT-B, GT-C und GT-D. Für Glykosyltransferasen der Superfamilien GT-A, GT-B und GT-C sind Kristallstrukturen verfügbar [24 – 26] (Abbildung 1.2). Die Zuordnung zur GT-D-Superfamilie beruht auf Strukturvorhersagen mittels bioinformatischer Methoden [27]. Glykosyltransferasen der Superfamilien GT-A, GT-B und GT-C kommen bei Eukaryoten und Prokaryoten vor [22, 27]. Die Vertreter der Superfamilie GT-D wurden bisher ausschließlich bei Eukaryoten gefunden [22, 27 – 29]. Die Topologie der Superfamilien GT-A und GT-B ist die am besten untersuchte. Über die Superfamilien GT-C und GT-D ist nur wenig bekannt.

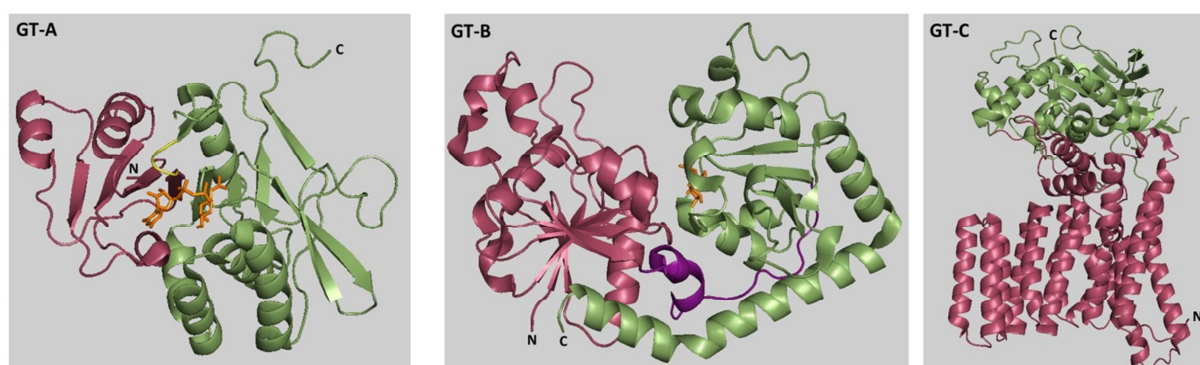


Abbildung 1.2: Tertiärstrukturen der Superfamilien GT-A, GT-B und GT-C.

Beispielhaft sind die Kristallstrukturen der α -1,4-N-Acetylhexosaminyltransferase (EXTL2, PDB 1OMZ, [30]) für die Superfamilie **GT-A** und die der β -Glucosyltransferase BGT des T4 Phagen (PDB 1JG7, [31]) für die Superfamilie **GT-B** gezeigt. Zusätzlich ist die bakterielle Oligosaccharyltransferase PglB (PDB 3RCE, [32]) für die Superfamilie **GT-C** dargestellt. Die Farbgebung ist wie folgt gewählt: rot, N-terminale Domäne; grün, C-terminale Domäne; gelb, DXD-Motiv (GT-A); lila, Linker-Region (GT-B); orange, Zuckerdonor (GT-A und GT-B). Die Grafiken wurden erstellt mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System (PyMOL™ Evaluation Product)).

Bei den Superfamilien GT-A und GT-B sind die N-terminale und die C-terminale Domäne durch eine Linker-Region verbunden. Die Domänen weisen eine unterschiedliche Struktur auf, sind aber räumlich sehr eng miteinander assoziiert [11, 33, 34]. Das aktive Zentrum liegt in einer Spalte zwischen den beiden Domänen [11, 22, 35]. Abhängig von der Superfamilie binden die Domänen spezifisch den Zuckerdonor oder den Zuckerakzeptor (Tabelle 1.2) [4, 8, 35]. Durch die Bindung des Zuckerdonors kommt es zur Umlagerung einer flexiblen Schleife,

sodass die Glykosyltransferase in eine geschlossene Konformation überführt wird. Erst die geschlossene Form ermöglicht die korrekte Bindung des Zuckerakzeptors [22, 31, 36, 37]. Diese Umlagerung konnte unter anderem am Beispiel der β -Glucosyltransferase des Bakteriophagen T4 gezeigt werden [25, 38]. Beide Superfamilien weisen eine Supersekundärstruktur ähnlich der Dinukleotid-bindenden Rossmann-Faltung auf [39, 40]. Diese Faltung wurde erstmals 1973 von Michael G. Rossmann als gemeinsame Struktur von Nukleotid-bindenden Proteinen beschrieben [41]. Die Rossmann-Faltung besteht aus zwei β - α - β - α - β -Motiven, die zusammen ein sechs-strängiges, paralleles β -Faltblatt in einer 321456-Topologie bilden, welches durch die α -Helices flankiert wird (Abbildung 1.3). In manchen Proteinen mit einer Rossmann-Faltung variiert die Anzahl der β -Stränge [42].

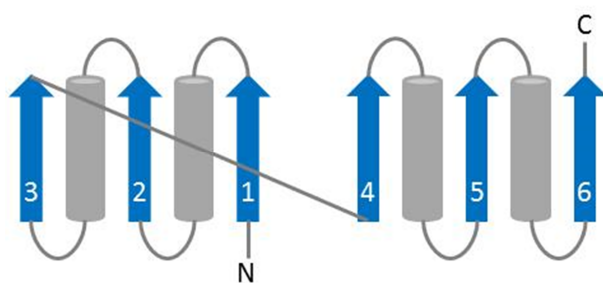


Abbildung 1.3: Rossmann-Faltung [41].

Nukleotid-bindende Proteine weisen zwei Motive mit alternierenden Sekundärstrukturen von β -Faltblättern (blau) und α -Helices (grau) auf. Die Anordnung einzelner β -Faltblätter kann dabei auch antiparallel gestaltet sein.

Tabelle 1.2: Zuordnung Substrat-bindender Domänen und Topologie von strukturellen Superfamilien.

	GT-A	GT-B
Zuckerdonor-Bindung	N-terminale Domäne	C-terminale Domäne
Zuckerakzeptor-Bindung	C-terminale Domäne	N-terminale Domäne
Rossmann-Faltung	eine Rossmann-ähnliche α - β - α -„sandwich“-Faltung	zwei voneinander getrennte Rossmann-ähnliche Domänen

Glykosyltransferasen der Superfamilie GT-A besitzen eine Rossmann-ähnliche α - β - α -„sandwich“-Faltung (Abbildung 1.2 und Abbildung 1.4) [24, 39]. Die β -Stränge bilden dabei ein zentrales β -Faltblatt bestehend aus sechs bis sieben β -Strängen mit einer 321465(7)-Topologie, wobei einer der β -Stränge antiparallel zu den anderen angeordnet ist (Abbildung 1.4) ([43, 44], zusammengefasst in [22, 27]). Flankiert wird dieses β -Faltblatt nicht nur durch die α -Helices sondern auch durch ein kleineres β -Faltblatt (Abbildung 1.4). Das für die Superfamilie GT-A typische DXD-Motiv (Asp-X-Asp) oder Varianten (DDD, DXX oder XXD) liegt in einer Schleife zwischen dem großen, zentralen und dem kleinen, flankierenden β -Faltblatt (zusammengefasst in [22, 27]). Die Aminosäurereste dieses Motivs koordinieren dabei ein für die Zuckerdonor-Bindung notwendiges Kation [11, 45]. Die ersten 120 Aminosäuren (N-terminale Domäne), die an das DXD-Motiv grenzen, binden den Zuckerdonor ([43, 44], zu-

sammengefasst in [22]). Für die Bindung des Zuckerakzeptors ist neben der Konformationsänderung [46] vor allem die in Sequenz und Struktur variable C-terminale Domäne notwendig [22, 27]. Die Spezifität für den Zuckerakzeptor und die Regioselektivität von Glykosyltransferasen der GT-A Superfamilie werden durch eine hohe Variabilität C-terminaler β -Faltblätter, α -Helices und/oder häufig auch der Bereiche ohne Sekundärstrukturen beeinflusst [35].

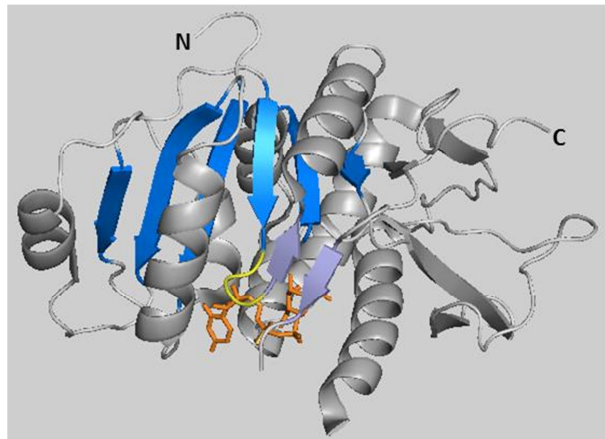


Abbildung 1.4: Tertiärstruktur der GT-A Superfamilie.

Die Superfamilie GT-A besitzt eine Rossmann-ähnliche α - β - α -„sandwich“-Faltung, bei der die β -Stränge ein zentrales β -Faltblatt bilden (blau). Flankiert wird dieses β -Faltblatt durch α -Helices (grau) und durch ein kleineres β -Faltblatt (flügel). Das für die Superfamilie GT-A typische DXD-Motiv liegt in einer Schleife (gelb) zwischen dem zentralen und dem flankierenden β -Faltblatt. Gezeigt ist die α -1,4-N-Acetylhexosaminyltransferase EXTL2 mit gebundenem Zuckerdonor (orange) (PDB 1OMZ, [30]). Die Grafik wurde erstellt mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System (PyMOL™ Evaluation Product)).

Bei der Superfamilie GT-B [25] können die C- und N-terminale Domäne als zwei voneinander getrennte Rossmann-ähnliche Domänen betrachtet werden, die mittels einer Linker-Region flexibel miteinander verknüpft sind (Abbildung 1.5) [11, 22, 39]. Die β -Stränge innerhalb der zwei Rossmann-ähnlichen Domänen bilden ein sechs-strängiges β -Faltblatt mit einer 321456-Topologie (zusammengefasst in [27]). Einen stark konservierten Bereich wie etwa das DXD-Motiv oder andere konservierte Aminosäuren gibt es bei den Glykosyltransferasen der Superfamilie GT-B nicht [12]. Durch die durch die Linker-Region getrennten Domänen resultiert eine breite Spalte, welche das aktive Zentrum beherbergt [11]. Im Gegensatz zur Superfamilie GT-A ist für die Superfamilie GT-B die Beteiligung der C-terminalen Domäne an der Zuckerdonor-Bindung beschrieben [35, 47]. Positiv geladene Aminosäuren (Arg, His, Lys) ermöglichen die Bindung des Nukleosiddiphosphat-Zuckers [35]. Dabei beeinflussen die Konformation und Länge von Schleifen-Strukturen die Bindung der Nukleinbase. Die Bindung des Zuckerakzeptors erfolgt in einer hydrophoben Tasche der N-terminalen Domäne [22, 35, 48]. Die darin befindlichen positiv geladenen Aminosäurereste (zum Beispiel His25 bei Ole1) die-

nen als katalytische Base für den Zuckerakzeptor [49, 50]. Die Aminosäuresequenz im Bereich der Bindetasche ist sehr variabel, sodass sich aus der Primärstruktur kein Rückschluss auf die Spezifität einer Glykosyltransferase in Bezug auf den Zuckerakzeptor ziehen lässt (zusammengefasst in [22]).

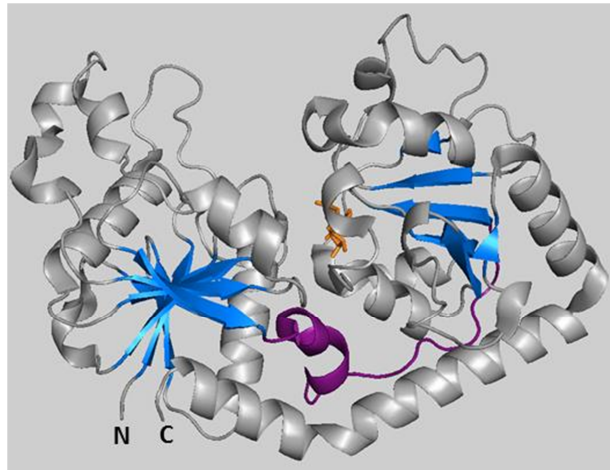


Abbildung 1.5: Tertiärstruktur der GT-B Superfamilie.

Die Superfamilie GT-B besitzt zwei voneinander getrennte Rossmann-ähnliche Domänen, die mittels einer Linker-Region (lila) flexibel miteinander verbunden sind [11, 22]. Es resultiert eine breite Spalte, in welcher das aktive Zentrum lokalisiert ist. Die β -Stränge innerhalb der zwei Rossmann-ähnlichen Domänen bilden ein sechssträngiges β -Faltblatt mit einer 321456-Topologie (blau). Gezeigt ist die β -Glucosyltransferase BGT des T4 Phagen mit gebundenem Zuckerdonor (orange) (PDB 1JG7, [31]). Die Grafik wurde erstellt mit PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System (PyMOL™ Evaluation Product)).

Die Gruppierung von Glykosyltransferasen in vier Struktursuperfamilien ist hilfreich, wird der großen Vielfalt an Strukturen aber nur zum Teil gerecht. So zeigten Untersuchungen an bakteriellen und humanen Sialyltransferasen, dass schon innerhalb der Superfamilie GT-A Subtypen bezüglich des Faltungsmusters auftreten [51, 52]. Darüber hinaus wurde mit der Charakterisierung der „*penicillin-binding protein*“-Domäne PBP1A der Peptidoglykan-Glykosyltransferase aus *Aquifex aeolicus* (Aquificaceae, Aquificiales, Bacteria) ein bislang unbeschriebenes Faltungsmuster nachgewiesen [53].

1.2.2.2 Stereospezifische Einteilung

Bei der Knüpfung der glykosidischen Bindung bleibt die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms des Zuckers entweder erhalten oder sie wird invertiert (Abbildung 1.6). Daraus resultieren die Klassen der sogenannten konfigurationserhaltenden („*retaining*“) bzw. -invertierenden („*inverting*“) Glykosyltransferasen [11, 54]. Diese Einteilung ist unabhängig von der Einteilung in strukturelle Superfamilien [21].

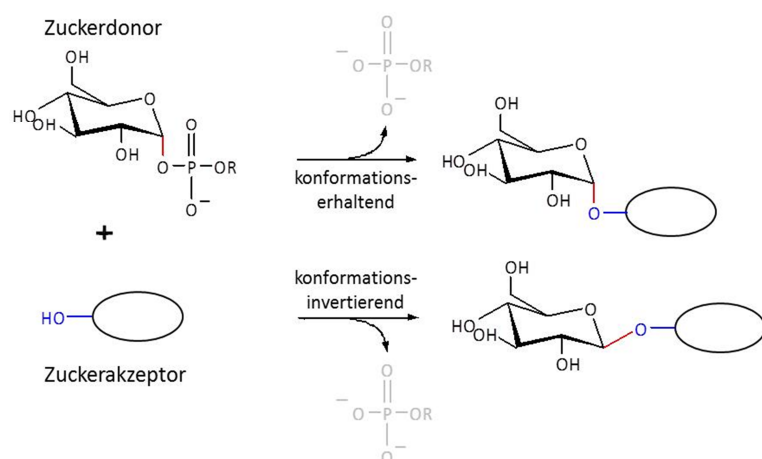


Abbildung 1.6: Stereospezifität von Glykosyltransferasen.

Bei der Knüpfung der glykosidischen Bindung bleibt die α -Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms des Zuckers in Abhängigkeit von der Glykosyltransferase entweder erhalten („*retaining*“, oben) oder sie wird in die β -Konfiguration überführt („*inverting*“, unten).

Den invertierenden Glykosyltransferasen liegt ein S_N2 -ähnlicher Mechanismus zugrunde (zusammengefasst in [11]). Dieser wurde erstmals nach Untersuchungen an der humanen Fucosyltransferase $\alpha 3$ -FucT vorgeschlagen [55]. Dabei wird der Zuckerakzeptor durch einen als katalytische Base wirkenden Asparagin- oder Glutaminsäurerest deprotoniert, sodass ein nukleophiler Angriff des Zuckerakzeptors am anomeren C-Atom des aktivierten Zuckers möglich wird (Abbildung 1.7) [24, 56]. Daneben wurden Glykosyltransferasen identifiziert, bei denen der Imidazolring eines Histidinrestes als katalytische Base fungiert [49, 57]. Die Ladung der Phosphat-Abgangsgruppe (Abbildung 1.7) wird auf unterschiedliche Weise stabilisiert. Während dieses bei den Glykosyltransferasen der Superfamilie GT-A entweder in Abhängigkeit oder unabhängig von divalenten Kationen geschieht [11, 52, 58], wurde für die Glykosyltransferasen der Superfamilie GT-B eine elektrostatische Stabilisierung unter Beteiligung von positiv geladenen Aminosäureresten [11] oder eines Helixdipols [59, 60] gezeigt.

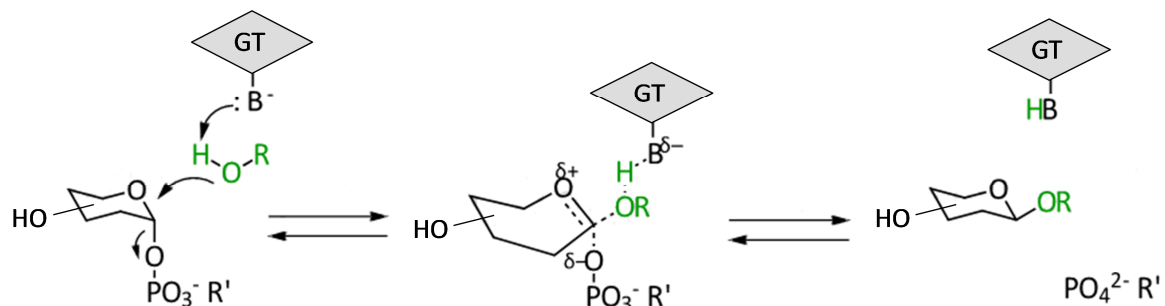


Abbildung 1.7: Konfigurationsändernder Mechanismus von Glykosyltransferasen.

Die Änderung der Konfiguration des anomeren C-Atoms des Zuckerdonors erfolgt in einer einstufigen bimolekularen, nukleophilen Substitution. Das Zuckerakzeptormolekül wird dabei durch einen Asp-, Glu- oder His-Rest als katalytische Base des Enzyms deprotoniert, sodass es als Nukleophil mit dem Zuckerdonor reagiert. Im Übergangszustand bildet sich ein Oxocarbenium-Ion. Die elektrostatische Stabilisierung der Abgangsgruppe erfolgt dabei in Form von positiven Ladungsträgern (nicht gezeigt). GT = Glykosyltransferase; B = Base; ROH (grün) = Zuckerakzeptor; R' = in der Regel ein Nukleosid. Abbildung nach [61].

Kapitonov et al. identifizierten bei der Untersuchung von Glykosyltransferasen konservierte Aminosäuren und Motive in Domänen, die für die Substraterkennung und die katalytische Reaktion dieser Enzyme essentiell sind [62]. Daraus leiteten sie für konfigurationsinvertierende Glykosyltransferasen ein Motiv ab, das für die Erkennung von Pyrimidin-Nukleotiden essentiell ist. Dieses Motiv wurde als „*nucleotide recognition domain*“ 1 β (NRD1 β , R/HX₇E [63]) bezeichnet und ist in 140 Glykosyltransferasen vorhanden. Das Motiv besitzt eine große („*large*“, L) und eine kleine („*small*“, S) Domäne, wobei die große Domäne NRD1 β L eine Serin/Threonin-Phosphorylierungsstelle beinhaltet. Die NRD1 β -Glykosyltransferasen können in fünf Klassen unterteilt werden (Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: Klassen der NRD1 β -Glykosyltransferasen [62].

NRD1 β -Klasse	Glykosyltransferasen
I	große Proteine (~950 - 1050 Aminosäuren) mit Homologie zu Glykosyltransferasen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Caenorhabditis elegans</i>
II	mittelgroße Proteine (~700 Aminosäuren) aus <i>C. elegans</i>
III	alle bakteriellen Glykosyltransferasen
IV	alle pflanzlichen Glykosyltransferasen
V	weitere Glykosyltransferasen aus <i>C. elegans</i> (Glucuronosyltransferase und Ceramid-Galactosyltransferase)

Zusätzlich wurde in pflanzlichen Glykosyltransferasen, die dem invertierenden Mechanismus folgen, das hoch konservierte „*plant secondary product GT*“-Motiv (PSPG-Box, [64]) identifiziert [18]. Es besteht aus 40 Aminosäuren und enthält in 95 % der Glykosyltransferasen zwei konservierte Peptidsequenzen (WAPQV und HCGWNS, hoch konservierte Aminosäuren sind unterstrichen) [18]. Es wird angenommen, dass die komplette PSPG-Box die Stelle für die Zuckerdonor-Bindung darstellt [18].

Für die konfigurationserhaltenden Glykosyltransferasen werden aktuell zwei Mechanismen diskutiert [11, 61, 65] (Abbildung 1.8). Beide Mechanismen werden in Analogie zu denen der Glykosylhydrolasen postuliert, bei denen ebenso zwischen konfigurationserhaltenden und -invertierenden Enzymen unterschieden wird [66, 67]. Einer der vorgeschlagenen Mechanismen ist der konsekutive, doppelte S_N2 -Mechanismus (Abbildung 1.8 A; „double displacement mechanism“), bei dem ein kurzlebiges kovalentes Glykosyl-Enzym-Intermediat gebildet wird [67]. Experimentell wurde dieser Mechanismus für Enzyme der Superfamilie GT-A, speziell der α 3-Galactosyltransferasen der Säugetiere und Glykosyltransferasen des AB0(H)-Blutgruppensystems, gezeigt [68, 69]. Alternativ wurde anhand von Untersuchungen der bakteriellen Glykosyltransferase LgtC aus *Neisseria meningitidis* ein S_{Ni} - bzw. S_{Ni} -artiger Mechanismus mit einem Oxocarbenium-Ion als Intermediat postuliert (Abbildung 1.8 B; [44, 70, 71]). Mit Untersuchungen an der Trehalose-6-phosphat-Synthase aus *Escherichia coli* K12 wurden Hinweise darauf gefunden, dass für den Erhalt der Konfiguration der nukleophile Angriff des Zuckerakzeptors auf der Seite des Zuckerrings stattfindet, an der sich die Abgangsgruppe befindet [72]. Bei den konfigurationserhaltenden Glykosyltransferasen findet sich in der Primärsequenz die NRD1 α -Domäne (EX₇E [63]). Diese wurde bisher in 77 Glykosyltransferasen (den NRD1 α -Glykosyltransferasen) identifiziert [62].

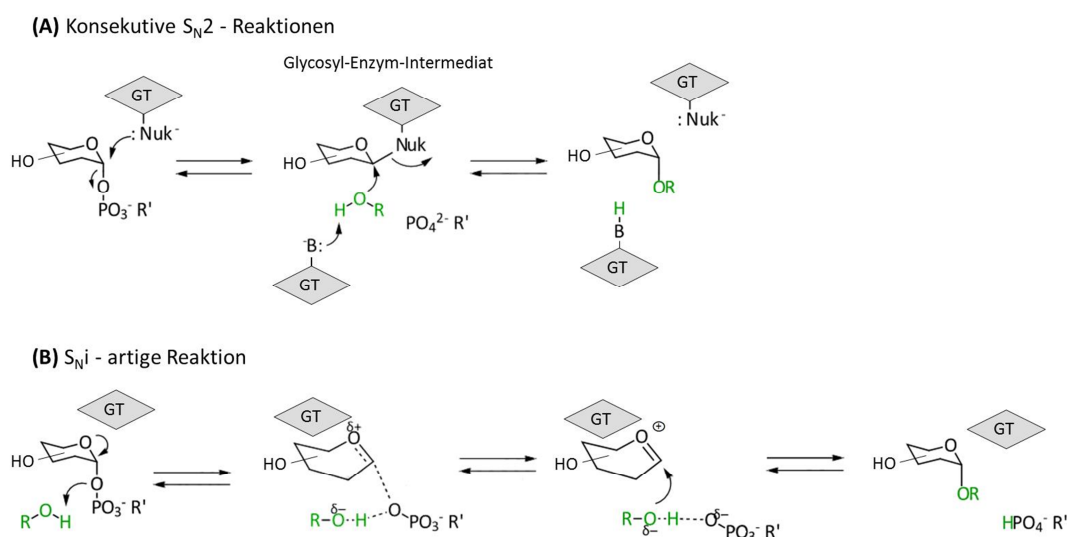


Abbildung 1.8: Konfigurationserhaltende Mechanismen von Glykosyltransferasen.

Zum Erhalt der Konfiguration gibt es zwei Erklärungsansätze für den zugrunde liegenden Mechanismus. Bei der doppelten nukleophilen Substitution **(A)** fungiert eine Seitenkette der Glykosyltransferase als Nukleophil, das im ersten Schritt das anomere Kohlenstoffatom des Zuckerdonors angreift. Es bildet sich ein Glykosyl-Enzym-Intermediat. Anschließend greift der deprotonierte Zuckerakzeptor das Intermediat als Nukleophil an. Die Deprotonierung wird entweder durch eine enzymständige katalytische Base oder durch die Abgangsgruppe selbst vermittelt. Bei der alternativ diskutierten inneren nukleophilen Substitutionsreaktion **(B)** verlaufen der Angriff des Zuckerakzeptors und der Bruch der Abgangsgruppe entweder zeitgleich oder schrittweise [72]. Das Oxocarbenium-Ion wird dabei von der Glykosyltransferase stabilisiert. GT = Glykosyltransferase; B = Base; ROH (grün) = Zuckerakzeptor; R' = in der Regel ein Nukleosid; Nuk = Nukleophil. Abbildung nach [61].

1.3 Enzym-Engineering mit Glykosyltransferasen

1.3.1 Austausch einzelner Aminosäuren

Die synthetische Herstellung von Glykosiden ist oft mit aufwendigen und komplizierten chemischen Verfahren verbunden. Dabei stellt die Synthese stereo- und regiospezifischer Produkte eine besondere Herausforderung dar. Die Verwendung von Glykosyltransferasen ermöglicht dagegen die spezifische Glykosylierung verschiedenartiger Aglyka unter physiologischen Bedingungen. Die Substratspezifität macht jedoch die Verwendung von natürlich vorkommenden Glykosyltransferasen für eine flexible Glykodiversifizierung schwierig. Daher hat man versucht, Glykosyltransferasen gezielt zu modifizieren. Im Idealfall erhält man maßgeschneiderte Enzyme, auf die man als Werkzeuge zurückgreift, um verschiedene Substrate an bestimmten Positionen mit jedem gewünschten Zucker verknüpfen zu können. Zur Konstruktion maßgeschneiderter Glykosyltransferasen sind daher solche mit einer variablen Zuckerakzeptor- oder Zuckerdonor-Domäne, wie sie zum Beispiel bei Härle und Bechthold tabellarisch zusammengefasst wurden, geeignet [73]. Die Herstellung maßgeschneiderter Enzyme geschieht auf Basis von rationaler und/oder zufälliger Mutagenese im Rahmen des „*protein engineering*“. Während für das rationale Proteindesign, zum Beispiel durch ortsgerichtete Mutagenese, Kenntnisse über die Struktur und Sequenz der DNA für die Veränderung einzelner Eigenschaften notwendig sind, kommt die gerichtete Evolution („*directed evolution*“) in der Regel ohne dieses Wissen aus [74 – 77]. Viele Versuche, die Substratspezifität von Glykosyltransferasen zu ändern, sind bei Hancock et al. [78] beschrieben. Vorwiegend war dabei die Technik der ortsgerichteten Mutagenese von Erfolg [78]. Die Anwendung der zufallsbasierten Mutagenese zur gerichteten Evolution erfordert die anschließende Selektion und Identifizierung verbesserter Mutanten aus einer entstandenen Bibliothek. Dabei bedingt die enorme Anzahl zu untersuchender Mutanten den Einsatz von Hochdurchsatz-Testverfahren [79 – 81].

Die Modifikationen durch gerichtete Evolution führten zu Änderungen der Aktivität und Substratspezifität. Beispiele dafür sind die Oleandomycin Glykosyltransferase OleD aus *Streptomyces antibioticus* [82, 83] und die humane 3- α -Galactosyltransferase [84, 85]. OleD ist eine Glucosyltransferase der Superfamilie GT-B, die die Glykosylierung von Oleandomycin katalysiert. Der Austausch von drei Aminosäuren (zwei in der Zuckerakzeptor- und eine in der Zuckerdonor-Domäne) verringerte die Spezifität des Enzyms gegenüber verschiedenen Zuckerdonoren [82 – 85]. Auch die Spezifität in Bezug auf den Zuckerakzeptor wurde beein-

flusst. Der Umsatz von 4-Methylumbelliferon wurde durch den Austausch der drei Aminosäuren um das 30-fache gesteigert und der des Novobiocin-Aglykons um das Fünffache [82]. Eine andere Dreifach-Mutante zeigte einer Steigerung der Aktivität mit dem Novobiocin-Aglykon um das 150-fache gegenüber der unveränderten OleD [83].

Die 3- α -Galactosyltransferase GTB und die 3- α -N-Acetylgalactosaminyltransferase GTA des humanen AB0(H)-Blutgruppensystems gehören zur Superfamilie GT-A. Dabei trägt die GTB zur Bildung des B-Antigens bei, indem sie den Galactosyl-Rest des Donors Uridindiphosphat (UDP)-Galactose auf das H-Antigen transferiert. Derselbe Zuckerakzeptor wird von der GTA verwendet, um durch den Transfer von N-Acetylglucosamin (GalNAc) von UDP-GalNAc auf das H-Antigen das A-Antigen zu bilden [84]. Durch ortsgerichtete Mutagenese direkt hinter dem DXD-Motif der GTB wurden Mutanten erzeugt, die sowohl GTA- als auch GTB-Aktivität besaßen [85].

1.3.2 Erzeugung chimärer Glykosyltransferasen

Chimäre Glykosyltransferasen aus zwei verschiedenen Enzymen werden durch die Mischung ganzer Domänen („*domain swapping*“) oder definierter Segmente („*domain shuffling*“) erzeugt (Abbildung 1.9). Da Glykosyltransferasen der Superfamilien GT-A und GT-B aus zwei durch eine Linker-Region verbundenen Domänen bestehen und den jeweiligen Domänen eine Zuckerdonor- bzw. Zuckerakzeptor-Spezifität zugeordnet werden kann, bietet sich diese Art der Veränderung geradezu an [86].

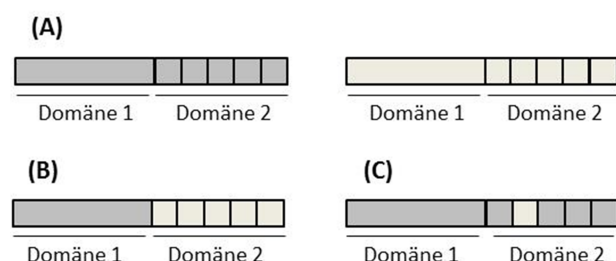


Abbildung 1.9: Erzeugung chimärer Gene mittels „domain swapping“ oder „domain shuffling“.

Aus den Genen für zwei Proteine (Wildtyp) **(A)** werden chimäre Gene erzeugt, die für Proteine mit komplettem Domänen austausch **(B)** oder für Proteine mit Austausch einzelner Segmente (Quadrate) **(C)** kodieren. Die einzelnen Domänen sind durch einen Strich unterhalb der dargestellten Gene kenntlich gemacht.

Diverse Publikationen belegen den Erfolg von „*swapping*“- und/oder „*shuffling*“- Strategien zur Modifikation von pflanzlichen und bakteriellen Glykosyltransferasen der Superfamilie GT-B (Tabelle 1.4). Bei allen aktiven chimären Glykosyltransferasen wurde neben der Substrat- und/oder Regiospezifität auch die katalytische Aktivität verändert.

Tabelle 1.4: Chimäre Enzyme aus bakteriellen und pflanzlichen Glykosyltransferasen mit einem bis drei Fusionspunkten.

Die Glykosyltransferasen gehören zur Superfamilie GT-B und sind bakteriellen (schwarz) oder pflanzlichen (grau) Ursprungs. UGT, UDP-Glykosyltransferase; k.A.: keine Angabe in Veröffentlichung.

Produkte	Enzym 1	Enzym 2	Aminosäureidentität	Anzahl Chimäre		Quelle
				erzeugt	aktiv	
GalNAc	11639FucT	UA948FucT	76 %	12	12	[36]
Glykopeptid-antibiotika	Orf10*	GtfB	70 %	2	2	[87]
	Orf1	GtfA	66 %	2	1	
	UGT71C1	UGT71C2	78 %	3	3	[88]
	UGT71C1	UGT71E1	38 %	4	2	
	UGT71C2	UGT71E1	39 %	1	1	
Glykoside von z. B. Benzoaten, Salicylsäure, Terpenoiden, Cyanhydrinen oder Anthocyanidine	UGT71C1	UGT88B1	28 %	1	k. A.	
	UGT88B1	UGT71E1	36 %	2	k. A.	
	UGT85C1	UGT71C2	23 %	2	2	
	UGT71C1	UGT85C1	22 %	1	1	
	UGT71E1	UGT85C1	22 %	1	1	
	UGT85C1	UGT94B1	23 %	1	k. A.	
	UGT85B1	UGT94B1	21 %	1	k. A.	
	UGT85C1	UGT85B1	33 %	2	k. A.	
Angucyclin-antibiotika	LanGT1	LndGT1	75 %	10	10	[89]
Glykoside von z. B. Benzoaten, Salicylsäure	UGT74F1	UGT47F2	76 %	7	7	[90]
Aminoglykosid- bzw. Glykopeptidantibiotika	KanF	GtfE	17 %	> 3	> 3	[91, 92]
Glykosid von Tetrahydrobiopterin	CY-007	CY-049	93 %	2	2	[93]

Hansen et al. [88] erzeugten 20 chimäre Enzyme aus sieben pflanzlichen Familie 1 UDP-Glykosyltransferasen mit Hilfe von Aminosäuresequenzvergleichen, Sekundärstrukturvorhersagen und molekularen Modellen. Bei der Wahl des Fusionspunktes wurden konservierte sekundäre und tertiäre Strukturmerkmale beider Domänen und das C-terminale Motiv der PSPG-Box berücksichtigt [88]. Die Ergebnisse zeigten, dass Mitglieder nah verwandter Unterfamilien (UGT71C1 und UGT71C2; 78 %), Mitglieder unterschiedlicher Unterfamilien (UGT71E1 und UGT71C1; 38 %) und Enzyme entfernt verwandter Genfamilien (UGT71C1 und

UGT85C1; 22 %) für die Chimerisierung verwendet werden können [88, 94]. Durch die Wahl des Fusionspunktes ergaben sich drei Gruppen chimärer Enzyme. Gruppe I umfasste 14 chimäre Glykosyltransferasen, bei denen der Fusionspunkt zwischen der N- und der C-terminalen Domäne der parental Enzyme liegt. In Gruppe II wurden vier chimäre Glykosyltransferasen mit einem Fusionspunkt im N-Terminus konstruiert. Gruppe III bestand aus zwei chimären Enzymen, die zwei Fusionspunkte enthielten und sich aus drei Segmenten von zwei oder drei parental Glykosyltransferasen zusammensetzten. Insgesamt waren zwölf chimäre Enzyme aktiv, wobei jede der drei Gruppen vertreten war. Die erzeugten Glykosyltransferasen wiesen eine veränderte Zuckerakzeptor- und/oder Regiospezifität auf. Zudem zeigte sich, dass die Zuckerakzeptor-Bindung auch von der C-terminalen Zuckerdonor-Domäne beeinflusst werden kann [88].

Am Beispiel von bakteriellen Glykopeptid-Glykosyltransferasen zeigten Truman et al. [87], dass sich Domänen von funktionell ähnlichen Glykosyltransferasen (Orf10* und GtfB) und von funktionell verschiedenen Enzymen (Orf1 und GtfA) zu aktiven Chimären fusionieren lassen [87]. Orf10* und GtfB verwenden ähnliche Zuckerdonoren, wohingegen die Zuckerdonoren von Orf1 und GtfA sehr verschieden sind. Die Identität der Primärsequenz beträgt für beide Paare 66 % - 70 %. Basierend auf Vergleichen der Primärsequenz wurden die Grenzen der Domänen und der Linker-Region bestimmt, um einen Fusionspunkt zu definieren. Für die Kombination aus Orf10* und GtfB wurde dazu im N-terminalen Bereich beider Glykosyltransferasen die Aminosäure Gln206 gewählt. Für die Glykosyltransferasen Orf1 und GtfA wurde als Fusionspunkt die Aminosäure Trp201 ausgewählt. Die chimären Glykosyltransferasen waren aktiv. Sie wiesen eine veränderte Substratspezifität auf. Die N-terminale Domäne bestimmte die Zuckerakzeptor-Bindung, die C-terminale Domäne die Zuckerdonor-Bindung. Auch im Fall dieser Chimäre wurde die Zuckerdonor-Bindung jedoch auch von der N-terminalen Zuckerakzeptor-Domäne beeinflusst.

Park et al. [92] zeigten am Beispiel bakterieller Glykosyltransferasen (KanF und GtfE), dass entfernt verwandte Enzyme zu aktiven chimären Glykosyltransferasen kombiniert werden können. Für den Fusionspunkt wurden mittels Sequenzvergleichen und Strukturvorhersagen die Linker-Regionen der parental Glykosyltransferasen bestimmt. Eine Chimäre mit einer hybriden Linker-Region (KE-Chimäre) aus neun Aminosäuren der KanF-Linker-Region und drei Aminosäuren der GtfE-Linker-Region wies die höchste Glykosylierungs-Aktivität auf [92]. Im Vergleich zur KE-Chimären zeigte ein Enzym mit einer Kombination der vollständigen Lin-

ker-Regionen aus KanF und GtfE eine um 13 % geringere Aktivität. Die Fusion beider Domänen mit ausschließlich der GtfE-Linker-Region führte zu einer Aktivitätsabnahme um 62 % verglichen mit der KE-Chimäre. Die molekulare Modellierung der chimären Glykosyltransferasen legte nahe, dass ein Zusammenhang zwischen der Länge der Linker-Region, der Tertiärstruktur und der Enzymaktivität besteht [92]. Da die Aktivität nur in Relation zur KE-Chimäre (100 %) angegeben wurde, ist keine Aussage über die Effektivität der Glykosylierung gegenüber den parental Enzymen möglich. Weiter bleibt unklar, ob die optimale Sequenz der Linker-Region ermittelt wurde [91, 92]. Eine weitere Veröffentlichung von Park et al. [91] beschreibt die Erzeugung einer Bibliothek chimärer Enzyme mittels einer zeitabhängigen Methode des schrittweisen DNA-Abbaus (zufällige Mutagenese (Kapitel 1.3.3), Abbildung 1.10, [95]) von *kanF* und *gtfE* mit allen Fusionspunkten zur Verbindung der N- und C-terminalen Domäne. Mit dieser Methode wurden 10^6 - 10^7 Transformanten erzeugt, die mit einem Nachweis einer pH-Änderung im Hochdurchsatz auf Glykosyltransferase-Aktivität untersucht wurden [91]. Für die Analyse der Linker-Region wurde die Plasmid-DNA aus je 30 aktiven und inaktiven Transformanten sequenziert. Die Ergebnisse zeigten eine ähnliche Größe der Gene aktiver chimärer Glykosyltransferasen (~1.400 bp) zu den Genen *kanF* (1.161 bp) und *gtfE* (1.227 bp). Die Gene der inaktiven Konstrukte wiesen mit 900 - 1800 bp eine deutlich kürzere oder längere Sequenz auf. Alle aktiven chimären Glykosyltransferasen wurden mit der KE-Chimäre aus der rationalen Chimerisierung [92] verglichen. Die Chimäre HMT31 aus der zufälligen Mutagenese wies eine viermal höhere katalytische Effizienz auf als die KE-Chimäre [91]. Die Linker-Region von HMT31 war mit 31 Aminosäuren (14 Aminosäuren von KanF und 17 Aminosäuren von GtfE) etwa 2,6-mal größer als die der KE-Chimäre. Die Ergebnisse von Park et al. [91, 92] deuten darauf hin, dass die zufällige Fusion von Domänen in der Linker-Region bei wenigen vorhandenen Strukturdaten der Glykosyltransferasen höhere Erfolgsaussichten hat als das rationale Design der Linker-Region.

Die vorgestellten Arbeiten [87, 88, 91, 92] zeigen, dass bei den Glykosyltransferasen der Superfamilie GT-B die Bindung des Zuckerakzeptors prinzipiell der N-terminalen Domäne und die Bindung des Zuckerdonors prinzipiell der C-terminalen Domäne zuzuordnen ist. Zudem weisen die oben genannten Arbeiten darauf hin, dass beide Domänen die Bindung des Zuckerakzeptors und des Zuckerdonors beeinflussen. Die Kombination der Glykosyltransferase-Domänen mittels „*domain swapping*“ und/oder „*domain shuffling*“ führte zu chimären Enzymen mit veränderter Zuckerakzeptor- und/oder Zuckerdonorspezifität und kataly-

tischer Aktivität. Die Ergebnisse zeigen, dass die Linker-Region nicht beliebig verändert werden kann und die Aktivität beeinflusst. Die Herstellung der DNA-Konstrukte in diesen Arbeiten erfolgte an definierten Fusionspunkten durch molekularbiologische Techniken wie Restriktion und Ligation, „*overlap extension*“ - Polymerasekettenreaktion (OE-PCR) oder zufällig mittels der „*incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*“-Technik (kurz ITCHY-Technik, [95, 96]).

1.3.3 Strategien zur Herstellung chimärer Glykosyltransferasen

Für das künstliche Proteindesign im Rahmen der gerichteten Evolution stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung [97]. Viele Anwendungen zur *in vitro* Evolution von Proteinen, wie das „*DNA shuffling*“ oder „*staggered extension process*“ (StEP), benötigen für die effektive Umsetzung eine relativ hohe Identität der verwendeten DNA-Sequenzen untereinander und bekannte Strukturdaten [76, 98, 99]. Für die Erzeugung von hybriden Proteinen, deren Gene keine oder nur geringe Ähnlichkeit aufweisen, veröffentlichten Ostermeier et al. eine Methode basierend auf einem schrittweisen Abbau von DNA unter Verwendung der Exonuklease III („*incremental truncation*“, [100]). Eine Reihe weiterer Anwendungen, darunter die Herstellung sogenannter „*incremental truncation libraries*“ (kurz ITLs) und die darauf aufbauende zeitabhängige Methode des schrittweisen DNA-Abbaus (ITCHY-Technik, Abbildung 1.10 A-E)), wurden aus dieser Technik entwickelt [95, 101, 102].

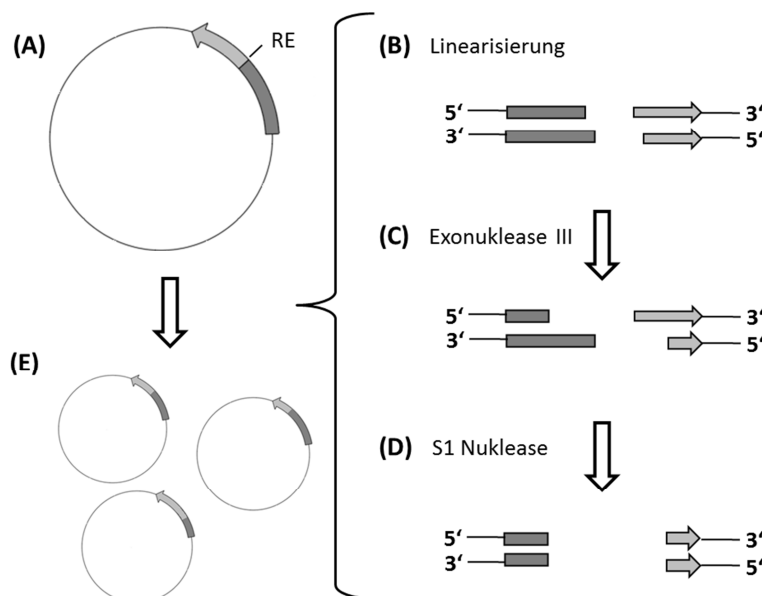


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung zur Herstellung einer Bibliothek chimärer Gene mittels ITCHY-Technik (nach Ostermeier [95, 96]).

(A) Die entsprechenden Gene (hell- und dunkel-grau) werden in einen Vektor kloniert. **(B)** Dieser wird mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease (RE) linearisiert. **(C)** Mit der Exonuklease III werden schrittweise einzelne Basen von dem zurückstehenden 3'-Hydroxylende der dsDNA deletiert. Die Probennahme erfolgt zu verschiedenen Zeitpunkten, so dass unterschiedlich lange Überhänge entstehen. **(D)** Mit der S1-Nuklease werden die, für die Ligation notwendigen, glatten Enden erzeugt. **(E)** Die in ihrer Sequenz verkürzten DNA-Vektoren stehen dann für weitere Anwendungen zur Verfügung.

Die zu fusionierenden Gensequenzen werden zunächst mittels PCR amplifiziert und über Restriktion und Ligation in einen Vektor eingebracht. Für die Aktivität der Exonuklease III, die im Folgenden zur Verkürzung der DNA verwendet wird, ist es zwingend erforderlich, dass bei der Linearisierung 5'-Überhänge erzeugt werden. Der Sequenzabschnitt, der für die Fusion vorgesehen ist, muss daher eine Schnittstelle für eine entsprechende Restriktionsendonuklease (z. B. *HindIII* oder *XhoI*) aufweisen. Durch die Probennahme zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlung mit der Exonuklease entstehen unterschiedlich lange dsDNA-Sequenzen. Mittels der Wahl der Temperatur, der Inkubationsdauer und der Konzentration an Exonuklease III wird dabei die Anzahl der abgespaltenen Basen beeinflusst. Die entstehenden Überhänge sind in der Regel nicht komplementär zueinander, so dass mit Hilfe einer einzelstrangspezifischen Nuklease (z. B. S1- oder „*mung bean*“-Nuklease) glatte Enden für eine Ligation erzeugt werden. Der gereinigte Ligationsansatz wird nachfolgend zur Transformation von *E. coli* verwendet, so dass eine Plasmidbibliothek in *E. coli* erhalten wird.

Mit der OE-PCR kann DNA hingegen gezielt verändert werden. In zwei separaten PCR-Ansätzen werden mit Hilfe der verwendeten Oligonukleotide die gewünschten Insertionen oder Deletionen durchgeführt. Bei der Insertion kann es sich um den Austausch eines Nukleotids oder weniger Nukleotidtripletts handeln. Anschließend werden diese Amplifikate in einer dritten PCR miteinander fusioniert und vervielfältigt [103 – 105]. Diese Technik findet Anwendung bei der gerichteten Fusion von Genen bzw. Genfragmenten (SOE-PCR, „*splicing by overlapping extension PCR*“ [105]). Jedes zu erzeugende Fragment benötigt dabei zwei spezifische Oligonukleotide, von denen mindestens eines einen Überhang aufweisen muss, welcher zum zweiten Fragment komplementär ist. Der weitere Aufbau der Oligonukleotide orientiert sich an der Zielsetzung der OE-PCR.

1.4 Hydrochinon-Glucosyltransferase und Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase

1.4.1 Hydrochinon-Glucosyltransferase

Die UDP-Glucose-abhängige Hydrochinon-Glucosyltransferase (AS, EC 2.4.1.218) glykosyliert Hydrochinon zum Hydrochinon-O- β -D-Glucosid (p-Arbutin) (Abbildung 1.11). Dabei wird die anomere Konfiguration der Glucose von α zu β invertiert. Eine Hydrochinon-Glucosyltransferase aus *Rauvolfia serpentina* (L.) BENTH (Apocynaceae) wurde von Arend et al. identifiziert [106, 107] und in die Familie GT1 innerhalb der GT-B-Superfamilie eingeordnet (CAZy-Datenbank). Bis heute ist die Kristallstruktur der Hydrochinon-Glucosyltransferase nicht aufgeklärt. Sequenzvergleiche mit Primärstrukturen ähnlicher pflanzlicher Glykosyltransferasen zeigten, dass die PSPG-Box in der Nähe des C-Terminus lokalisiert ist [108]. Für die Hydrochinon-Glucosyltransferase konnten in der PSPG-Box (Aminosäuren 341 - 385) die Peptidsequenzen WAPQ und HCGWNS identifiziert werden [108]. Innerhalb der PSPG-Box liegt die große NRD1 β -Domäne (Aminosäuren 363 - 374). Die kleine NRD1 β -Domäne liegt davor (Aminosäuren 266 - 272) (Abbildung 1.12).

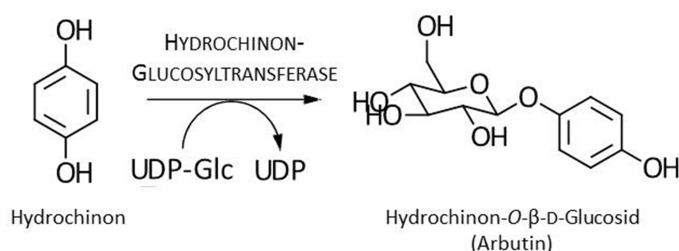


Abbildung 1.11: Glucosylierung von Hydrochinon zu p-Arbutin.

Die Hydrochinon-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.218) katalysiert ausschließlich die Bildung einer β -glykosidischen Bindung [108]. UDP-Glc, Uridindiphosphat-Glucose; UDP, Uridindiphosphat.

```

MEHTPHIAMV PTPGMGHLIP LVEFAKRLVL RHNFGVTFTII PTDGPLPKAQ 50
KSFLDALPAG VNYVLLPPVS FDDLPAADVRI ETRICLTITR SLPFVRDAVK 100
TLLATTKLAA LVVDLFGTDA FDVAIEFKVS PYIFYPTTAM CLSLFFHLPK 150
LDQMVSC EYR DVPEPLQIPG CIPIHGKDFL DPAQDRKND YKCLLHQAKR 200
YRLAEGIMVN TFNDLEPGPL KALQEEDQGK PPVYPIGPLI RADSSSKVDD 250
CECLKWLDDQ PRGSVLFISF GSGGAVSHNQ FIELALGLEM SEQRFLWVVR 300
                                NRD1 $\beta$ S
SPNDKIANAT YFSIQNQND LAYLPEGFLE RTKGRCLLVP SWAPQTEILS 350
HGSTGGFLTH CGWNSILESV VNGVPLIAWP LYAEQKMNAV MLTEGLKVAL 400
                                NRD1 $\beta$ L
RPKAGENGLI GRVEIANAVK GLMEGEEGKK FRSTMKDLKD AASRALSDDG 450
SSTKALAE LA CKWENKISST                                     470

```

Abbildung 1.12: Aminosäuresequenz von Hydrochinon-Glucosyltransferase aus *R. serpentina*.

Die N-terminale Zuckerakzeptor-Domäne (Aminosäuren 1 - 235) und die C-terminale Zuckerakzeptor-Domäne (Aminosäuren 264 - 470) werden mit einer Linker-Region (Aminosäuren 236 - 263, fett-kursiv) verbunden. Die kleine NRD1 β -Domäne (NRD1 β S, Aminosäuren 266 - 272), die große NRD1 β -Domäne (NRD1 β L, Aminosäuren 363 - 374) und die PSPG-Box (Aminosäuren 341 - 385, Kasten) mit zwei konservierten Peptidsequenzen (grau) sind angegeben.

Mutationsstudien zeigten, dass ein Austausch von Aminosäuren innerhalb der großen NRD1 β -Domäne einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität hat [109]. Eine ausführliche Charakterisierung erfolgte von Hefner et al. mit rekombinanter Hydrochinon-Glucosyltransferase [108]. Die biochemischen Untersuchungen zeigten zwei pH-Optima bei 4,5 und 6,8 bzw. 7,5 und ein Temperaturoptimum von 50°C. Die Produktbildung wurde durch 10 mM Mg²⁺ erhöht, wohingegen andere divalente Kationen (Mn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺) die Aktivität herabsetzten [108]. Der bevorzugte Zuckerakzeptor der Hydrochinon-Glucosyltransferase ist Hydrochinon ($K_m < 1 \mu\text{M}$). Die Hydrochinon-Glucosyltransferase akzeptiert aber 45 weitere Verbindungen als Substrat [108], zum Beispiel Phenolderivate wie Vanillin oder Thymol, Flavonoide wie Apigenin und Kämpferol oder das Hydroxycumarin Umbelliferon. Mit ihrer breiten Substratspezifität in Bezug auf den Zuckerakzeptor ist die Hydrochinon-Glucosyltransferase sowohl unter den Glykosyltransferasen als auch unter Enzymen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus als außergewöhnlich hervorzuheben [108]. Demgegenüber steht ihre hohe Spezifität für Pyrimidinnukleotid-aktivierte Glucose (UDP-Glc, $K_m = 77 \mu\text{M}$) als Zuckerdonor [108].

1.4.2 Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase

Die UDP-Galactose-abhängige Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase (GalT, EC 2.4.1.234) glykosyliert Kämpferol zum Kämpferol-3-O- β -D-Galactosid (Trifolin) (Abbildung 1.13) und wurde erstmals in *Petunia x hybrida* (Solanaceae) identifiziert [110]. Bei der Glykosylierung wird die anomere Konfiguration der Galactose von α zu β invertiert. Ebenso wie die Hydrochinon-Glucosyltransferase gehört die Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase nach der CAZy-Klassifizierung zur Familie GT1 und zu der Superfamilie GT-B. Eine Kristallstruktur dieser Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase ist bis heute nicht verfügbar. Das PSPG-Motiv (Aminosäuren 328 - 370) wurde im C-terminalen Bereich identifiziert [111, 112]. Das NRD1 β -Motiv wurde bislang nicht beschrieben. Das Enzym wurde in *E. coli* heterolog exprimiert [112]. Das Enzym ist in einem pH-Bereich von 4,5 - 9,5 und einem Temperaturbereich von 35 - 60°C aktiv. Die Optima liegen zwischen pH 7,5 - 8,0 und bei 50°C [112]. Die Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase akzeptiert als Zuckerakzeptoren ausschließlich Flavonole (darunter Kämpferol $K_m = 1,1 \mu\text{M}$ und Quercetin $K_m = 0,96 \mu\text{M}$) und als Zuckerdonor UDP-Galactose (UDP-Gal, $K_m = 426 \mu\text{M}$) [112], was sie als hochspezifisches Enzym auszeichnet.

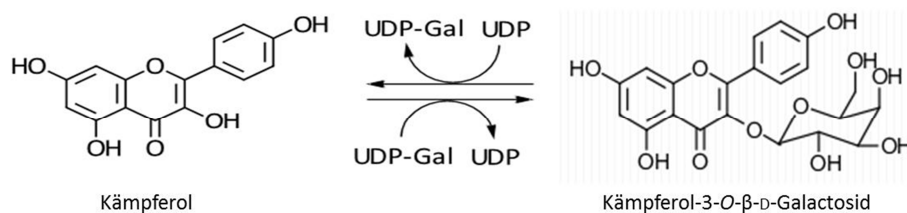


Abbildung 1.13: Verknüpfung von Kämpferol mit UDP-Galactose zum entsprechenden O-β-D-Galactosid.

Die Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase katalysiert die Glykosylierung von Kämpferol. Ist UDP unter bestimmten Bedingungen als Zuckerakzeptor verfügbar, katalysiert diese Glykosyltransferase den Transfer von Galactose von Kämpferol-3-O-β-D-Galactosid auf das Nukleotid („reverse sugar transfer“) [112]. UDP-Gal, Uridindiphosphat-Galactose; UDP, Uridindiphosphat.

1.5 Nachweisverfahren für Glykosyltransferasen

Die Aktivität von Glykosyltransferasen kann über verschiedene Verfahren nachgewiesen werden (Tabelle 1.5, zusammengefasst in [113, 114]):

- 1) Substratnachweis: Verbrauch von Zuckerakzeptor und/oder Zuckerdonor,
- 2) Produktnachweis: Bildung des Glykosides (Hauptprodukt) oder des Nukleotiddiphosphats (Nebenprodukt),
- 3) Nachweis der bei Glykosylierung freigesetzten Protonen als pH-Änderung mittels Farb-indikator.

Bei der Fusion von Domänen verschiedener Glykosyltransferasen können Glykoside entstehen, die nicht als Referenzsubstanz für die Identifizierung zur Verfügung stehen. Daher besitzen universelle Verfahren wie der Nachweis der pH-Änderung eine besondere Bedeutung. Der Nachweis der pH-Änderung mittels pH-Indikator wurde von mehreren Arbeitsgruppen *in vitro* mit Protein- und Gesamtproteinextrakten [92, 115, 116] und/oder *in vivo* als Koloniescreening [91] zum Nachweis von Glykosyltransferaseaktivität verwendet. Die Farbänderung wird *in vitro* in Küvetten oder Mikroplatten durch die Messung der Absorption spektrophotometrisch bestimmt. *In vivo* wird die Färbung der Bakterienkolonien visuell verfolgt. Park et al. [91, 92] setzten dieses Testsystem erfolgreich für die Identifizierung aktiver chimärer Glykosyltransferasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein. Das Screening von 10^6 - 10^7 Transformanten mit chimären *kanF/gtfE*-Genen [91] zeigte, dass sich der Nachweis der pH-Änderung für ein Hochdurchsatzverfahren für umfangreiche Bibliotheken mutierter bzw. chimärer Glykosyltransferasen eignet. Der Erfolg dieser Screeningmethode kann/könnte jedoch auch von den jeweils zu untersuchenden Enzymen und ihren Substraten abhängen. Arnold und Georgiou (in [117]) bemerken zur Problematik des Aktivitätsnachweises: „*The making of gene libraries is a clearly defined area where the same protocol is applicable to almost every*

gene. In contrast, screening and selection methods (as well as expression of the proteins to be screened) need to be specifically tailored for each protein and function.”

Tabelle 1.5: Aktivitätsnachweisverfahren für Glykosyltransferasen.

HPLC-DAD, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektor; HPLC-MS, HPLC in Kopplung mit Massenspektrometrie; NDP, Nukleosiddiphosphat.

Nachweis von	Beispiele	Quelle
Glykosid	HPLC-MS	[87, 89]
	HPLC mit Fluoreszenz-Detektor	[118]
	Fluoreszenz-markierte Durchflusszytometrie	[119, 120]
	Assays mittels Förster-Resonanzenergietransfer	[121 – 123]
	Immunologischer Nachweis der Glykoside	Primärquellen in [113]
	Massenspektrometrie	[124 – 126]
	„scintillation proximity assay“	[127 – 129]
Nukleotiddiphosphat	Nukleotid-Immunodetektion („Transcreener“)	[130]
	Fluoreszierender Chemosensor selektiv für NDP	[131, 132]
	Phosphatase-gekoppelter Assay	[133]
	Biolumineszenz („UDP-Glo Glycosyltransferase Assay“)	Promega [134]
Protonen	Nachweis der pH-Änderung	[91, 92, 115, 116]
Aglykon	<i>p</i> -Nitrophenol-markierter Zuckerakzeptor	[135]
Aglykon/Glykosid	Assay mittels Dünnschichtchromatographie	[136]
	Nachweis mittels Polyacrylamidgelelektrophorese	[136]
	HPLC-DAD	[137]

1.6 Zielstellung

Die physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit und Verteilungskoeffizient von Wirkstoffen stehen in engem Zusammenhang mit ihrer biologischen Wirkung und ihrer Pharmakokinetik, das heißt mit ihrer Resorption, ihrer Verteilung und ihrem Metabolismus. Eine Glykosylierung kann die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffes stark beeinflussen [138 – 140]. Viele Zucker sind hoch polar, sodass sich die Wasserlöslichkeit hydrophober Substanzen durch Glykosylierung erhöht [5, 141, 142]. Glykosylierungen sind synthetisch anspruchsvoll. Die enzymatische Glykosylierung nach dem Baukastenprinzip könnte eine Alternative darstellen, sofern sich die Spezifität der Glykosyltransferasen beeinflussen lässt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Hydrochinon-Glucosyltransferase aus *Rauvolfia serpentina* und die Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase aus *Petunia x hybrida* als Modellenzyme genutzt werden, um Methoden zur Erzeugung und zum Nachweis modifizierter Glykosyltransferasen zu erarbeiten. Aus der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase als Modellenzyme sollte eine chimäre Galactosyltransferase mit unspezifischer Zuckerakzeptor-Domäne erzeugt werden. Dazu sollte die Zuckerdonor-Domäne der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase an unterschiedlichen Fusionsstellen mit der Zuckerakzeptor-Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase verknüpft werden. Die Domänen sollten dafür entweder gezielt [143] oder zufällig (ITCHY-Technik [95, 96]) miteinander fusioniert werden, sodass eine Bibliothek chimärer Enzyme auf Glykosyltransferase-Aktivität untersucht werden kann. Dazu sollte ein effizientes Hochdurchsatzverfahren etabliert werden, das möglichst universell zum Aktivitätsnachweis von Glykosyltransferasen nach Expression in *E. coli* als Koloniescreening oder mit Gesamtproteinextrakten einsetzbar ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) und Thermo Fisher Scientific Bioscience GmbH (St. Leon-Rot) bezogen. Enzyme und Größenstandards stammten von den Firmen AppliChem GmbH, Thermo Fisher Scientific GmbH und Novagen (Merck4Bioscience, Merck KGaA, Darmstadt). Kits wurden von Thermo Fisher Scientific GmbH bezogen. Substrate für die Enzym-Tests wurden bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (UDP-Glucose, UDP-Galactose und Kämpferol) sowie bei Roth (p-Arbutin) mit einem Reinheitsgrad von $\geq 95,0\%$ oder „HPLC grade“ bestellt. Falls nicht anders angegeben, wurde demineralisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Alle Nährmedien wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (m/V) Agar hinzugegeben. Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika (Tabelle 2.1) genutzt. Die Stammlösungen der Antibiotika wurden bei -20°C gelagert. Die folgenden Medien kamen zum Einsatz.

LB-Medium („*Lysogeny broth*“ [144])

nach Miller:

0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 1,0 % (m/V) NaCl, 1,0 % (m/V) Trypton, pH 7,5

nach Lennox:

0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 0,5 % (m/V) NaCl, 1,0 % (m/V) Trypton, pH 7,5

TB-Medium („*Teriffic broth*“ [145])

2,4 % (m/V) Hefeextrakt, 0,4 % (m/V) Glycerol, 1,2 % (m/V) Trypton

900 ml des Mediums wurden vor Gebrauch mit 100 ml steriler Kaliumphosphat-Lösung (170 mM KH_2PO_4 , 720 mM K_2HPO_4) versetzt.

M9-Minimalmedium [146]

2 mM MgSO_4 , 0,4 % (V/V) Glucose-Lösung, 0,1 mM CaCl_2

Nach dem Autoklavieren wurde 20 % (V/V) einer 5x M9-Salzlösung steril hinzugegeben.

5x M9-Salzlösung [146]

40 mM NaCl, 90 mM NH_4Cl , 110 mM KH_2PO_4 , 240 mM Na_2HPO_4

SOC-Medium („*Super optimal broth with catabolite repression*“ [147])

0,5 % (m/V) Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 2,0 % (m/V) Trypton

Folgende Lösungen wurden nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben:

10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

Tabelle 2.1: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Stammlösung in
Ampicillin	100 µg*ml ⁻¹	Wasser
Chloramphenicol	34 µg*ml ⁻¹	Ethanol absolut
Gentamycin	20 µg*ml ⁻¹	Wasser

2.1.3 Indikatorlösungen

Die folgenden Stammlösungen wurden verwendet, um den Indikator in Medien und Reaktionsansätzen vorzulegen.

Kresolrot-Indikatorlösung I

2,65 mM Kresolrot, 1,65 mM NaOH, 19,2 % (V/V) Ethanol, pH 7,3

Kresolrot-Indikatorlösung II [148]

50 mM Kresolrot, 50 mM NaOH, pH 7,5

Bromthymolblau-Indikatorlösung

0,8 mM Bromthymolblau, 0,8 mM NaOH, 20 % Ethanol, pH 7,5

2.1.4 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Für die Konstruktion und Vervielfältigung von Plasmiden wurde der Laborstamm *E. coli* XL1blue verwendet. Die Stämme *E. coli* ArcticExpress (DE3) und BL21 (DE3) pLysS wurden für die heterologe Proteinproduktion eingesetzt. Der Genotyp jedes Stammes ist in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Stämme von *E. coli*.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent ^r]	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cm ^R)	Invitrogen (Life Technologies GmbH, Darmstadt)
<i>E. coli</i> XL1blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen)

Als Vektor für die Proteinproduktion diente pET15b (Novagen (Merck4Bioscience, Merck KGaA, Darmstadt)). Die verwendeten und erzeugten Plasmide sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete und erzeugte Plasmide.

Plasmid	relevante Eigenschaften	Quelle
pET15b	„low copy“ Plasmid mit „multiple cloning site“ und mit Sequenz für einen N-terminalem His ₆ -Tag, T7 Promotor, lac Operon.	Novagen (Merck4Bio-science, Merck KGaA, Darmstadt)
pQE-2_AS	Plasmid mit der cDNA der Hydrochinon-Glucosyltransferase aus <i>Rauvolfia serpentina</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q9AR73).	Dr. Leif Barleben
pMA-T_GalT _N	Plasmid mit der cDNA für die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1 - 237) der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase aus <i>Petunia x hybrida</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q9SBQ8).	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
pMA-T_GalT _C	Plasmid mit der cDNA für die Linker-Region und die C-terminale Domäne (Aminosäuren 238 - 451) der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase aus <i>Petunia x hybrida</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q9SBQ8).	Mr. Gene GmbH (Regensburg)
pET15b_GalT _C	Plasmid mit der cDNA für die Linker-Region und die C-terminale Domäne (Aminosäuren 238 - 451) der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase aus <i>Petunia x hybrida</i> als Matrize zur Herstellung des Plasmides pET15b_GalT _{fulllength} .	diese Arbeit
pET15b_AS _{fulllength}	Plasmid mit der cDNA der Hydrochinon-Glucosyltransferase aus <i>Rauvolfia serpentina</i> (UniProtKB/Swiss-Prot Q9AR73).	diese Arbeit
pET15b_GalT _{fulllength}	Plasmid mit der cDNA der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase aus <i>Petunia x hybrida</i> .	diese Arbeit
pET15b_AS _{x+y} GalT	Plasmide mit der cDNA für die N-terminale Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase und die C-terminale Domäne der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase mit bekannter Kombinationsstelle in der Linker-Region.	diese Arbeit
pET15b_ASGalT _{Bib}	Plasmid mit cDNA für die N-terminale Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase einschließlich Linker-Region (Aminosäuren 1 - 263) und die C-terminale Domäne der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase einschließlich Linker-Region (Aminosäuren 238 - 451). An der Fusionsstelle wurde eine <i>Xho</i> I-Schnittstelle integriert.	diese Arbeit
pET15b_ASGalT _{Chim}	Plasmide, welche eine Bibliothek chimärer cDNAs nach ITCHY [96, 102] darstellen. Sie wurden ausgehend vom Plasmid pET15b_ASGalT _{Bib} erstellt.	diese Arbeit

Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Invitrogen (Life Technologies GmbH (Darmstadt)) bezogen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 zu 100 pmol* μl^{-1} gelöst.

Tabelle 2.4: Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide.

Eingeführte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. ^S Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), ^E Eurofins Genomics (Ebersberg)

#	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
P1	AS-NdeI_for	AAACATATGGAGCATACACCTCACATTG
P2 ^S	GalT_NdeI-pET15b_for	GGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAGCAATTATCATGTTGC
P3 ^E	GalT-XhoI_for	GGCCTCGAGGGTCCGTTTAATCTG
P4	GalT-Bam_S_rev	AAAGGATCCTTAGTTACAAGAGGTGATGATGTCC
P5 ^S	GalT-NC_rev	GGGGTTGTGAGATTAAACGGACCCACGTTGAGAAAGTTGTTGAATTTGC
P6 ^E	GalT-RB-XhoI_f	GGCCTCGAGGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAATGGGTCCGTTTAATCTG
P7 ^E	AS-BamHI_1439_rev	GGGGATCCTTATGTACTGGAAATTTTG
P8 ^E	AS-XhoI_2_rev	GGCCTCGAGCCACGTGGCTGGTCATCTAGC
P9 ^S	AS-263+0-GalT_for	GGCTAGATGACCAGCCACGTGGGAGCGTTGCTTATATCGGATT
P10 ^S	AS-263+1-GalT_for	GGCTAGATGACCAGCCACGTGGGGGTAGCGTTGCTTATATCGG
P11 ^S	AS-262+2-GalT_for	GGCTAGATGACCAGCCACGTCCGGGTAGCGTTGCTTATATC
P12	AS235+1Gal_for	GGTAAGCCACCCGTTTATCCGGGTCCGTTTAATCTGACAACC
P13	AS235+2Gal_for	GGTAAGCCACCCGTTTATCCGCCGTTTAATCTGACAACCCCG
P14	AS236+1Gal_for	AAGCCACCCGTTTATCCGATCGGTCCGTTTAATCTGACAACC
P15	AS236+2Gal_for	AAGCCACCCGTTTATCCGATCCCGTTTAATCTGACAACCCCG
P16	AS236+3Gal_for	AAGCCACCCGTTTATCCGATCTTTAATCTGACAACCCCGCCTC
P17	AS237+2Gal_for	CCACCCGTTTATCCGATCGGACCGTTGTAATCTGACAACCCCG
P18	AS237+3Gal_for	CCACCCGTTTATCCGATCGGATTTAATCTGACAACCCCGCCTC
P19	AS237+4Gal_for	CCACCCGTTTATCCGATCGGAAATCTGACAACCCCGCCTCC
P20	AS238+3Gal_for	CCCGTTTATCCGATCGGACCATTTAATCTGACAACCCCGCCTC
P21	AS238+4Gal_for	CCCGTTTATCCGATCGGACCAATCTGACAACCCCGCCTCC
P22	AS238+5Gal_for	CCCGTTTATCCGATCGGACCACTGACAACCCCGCCTCCTAG
P23	AS239+4Gal_for	GTTTATCCGATCGGACCACTCAATCTGACAACCCCGCCTCC
P24	AS239+5Gal_for	GTTTATCCGATCGGACCACTCCTGACAACCCCGCCTCCTAG
P25	AS239+6Gal_for	GTTTATCCGATCGGACCACTCACAACCCCGCCTCCTAGTGC
P26	AS240+5Gal_for	TATCCGATCGGACCACTCATCCTCACAACCCCGCCTCCTAG
P27	AS240+6Gal_for	TATCCGATCGGACCACTCATCACAACCCCGCCTCCTAGTGC
P28	AS240+7Gal_for	TATCCGATCGGACCACTCATCACCCCGCCTCCTAGTGC

2.2 Standardmethoden

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurde die DNA mit 1/6 Volumen 6x DNA-„Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific) versetzt. Reaktionsansätze mit „DreamTaq Green PCR Master Mix“, „DreamTaq Green“-Puffer oder „FastDigest Green“-Puffer (Thermo Fisher Scientific) konnten direkt aufgetragen werden. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurden neben den Proben entsprechende Größenstandards aufgetragen.

Die Agarosegele wurden mit 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) angesetzt und zur Detektion der DNA mit Ethidiumbromid (10 mg*ml⁻¹) in einer Verdünnung von 1:30.000 versetzt. Die Agarosekonzentration wurde den jeweiligen Fragmentgrößen angepasst [149]. Die Elektrophorese wurde in 1x TBE bei einer Spannung von circa 80 - 100 Volt durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte im Anschluss mit der Software InfinityCapt (Version 15.06 für Windows) der Firma Vilber Lourmat (Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell) unter Beleuchtung mit UV-Licht (365 nm).

1x TBE

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und DNA-Reinigung

Die Extraktion der DNA aus der Agarosegelmatrix wurde nach Angaben des Herstellers mit dem „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ durchgeführt. Alternativ wurde DNA mittels des „GeneJET™ PCR Purification Kits“ ebenfalls nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Abweichend von den Protokollen des Herstellers erfolgte die Elution der aufgereinigten DNA mit 10 - 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5.

2.2.3 Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden die Plasmide nach Angaben des Herstellers mit dem „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ aus der Bakterienkultur isoliert. Die Elution erfolgte in 30 - 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5. Alternativ wurde die Isolierung mittels alkalischer Lyse mit anschließender Chloroformextraktion durchgeführt. Nach Zentrifugation von 2 - 4 ml Bakterienkultur bei circa 2.500 x g für fünf Minuten wurden die Zellen in 300 µl kaltem Puffer 1 resuspendiert. Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Weiter wurden 300 µl Puffer 2 für die Zellyse hinzugegeben und nach vier- bis sechsmaligem Invertieren wurde eine Inkubationsdauer von maximal fünf Minuten bei Raumtemperatur eingehalten. Zur Neutralisation wurden 300 µl Puffer 3 verwendet. Dieses

Gemisch wurde durch sofortiges, vier- bis sechsmaliges Invertieren homogenisiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der nach Zentrifugation (10.000 x g, 10 Minuten) erhaltene Überstand wurde mit einem Volumenteil Chloroform („HPLC-grade“) versetzt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Durch Zugabe von 0,7 Volumenteilen 2-Propanol zur wässrigen Phase und erneuter Zentrifugation (10.000 x g, 30 Minuten) wurde die Plasmid-DNA gefällt. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die präzipitierte DNA mit 500 µl 70 % (V/V) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10.000 x g, fünf Minuten) wurde der Alkohol vollständig entfernt und die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur für etwa 15 Minuten getrocknet. Abschließend wurde diese in 30 - 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst und bei -20°C gelagert.

Puffer 1

50 mM Tris/HCl, 10 mM Na-EDTA, pH 8,0 und 10 µg*ml⁻¹ RNase A

Puffer 2

200 mM NaOH und 1 % (m/V) Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“, SDS)

Puffer 3

3 M Kaliumacetat, pH 5,5 mit Eisessig

2.2.4 Quantifizierung von Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNA wurde die Plasmidpräparation zunächst 1:100 mit Wasser verdünnt. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette im Spektrophotometer (Ultrospec 3100 pro, GE Healthcare GmbH, München) bei 260 nm und 280 nm [150]. Dabei gilt für doppelsträngige DNA, dass eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von etwa 50 µg*ml⁻¹ entspricht. Die Reinheit kann mit Hilfe des Quotienten aus A_{260 nm} zu A_{280 nm} ermittelt werden [151].

2.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach der CaCl₂-Methode (basierend auf Mandel und Higa [152]). Zunächst wurde ein Vereinzelausstrich des entsprechenden Stammes auf LB-Festmedium vorbereitet. Nach der Kultivierung bei 37°C über Nacht wurden 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer einzelnen Kolonie beimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit 500 µl dieser Vorkultur erfolgte im Anschluss die Kultivierung von 50 ml LB-Flüssigkultur in einem 250 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 250 UpM bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5 - 0,8. Danach wurde die Bakterienkultur für zehn Minuten auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden bei 4°C und 3.000 UpM zentrifugiert (Beckman Coulter GS-6R, GH3.8 Rotor). Die Zellen wurden in 25 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resus-

pendiert. Nach einer erneuten Lagerung für zehn Minuten auf Eis folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 3.000 UpM für fünf Minuten. Die zentrifugierten Zellen wurden in 5 ml eiskalter Lösung aus 0,1 M CaCl₂ und 15 % (V/V) Glycerin resuspendiert. Die Stämme *E. coli* XL1blue und BL21 (DE3) pLysS wurden vor dem Aliquotieren für etwa 20 Stunden bei 4°C gelagert. Die Bakteriensuspension wurde zu 50 - 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen [153] wurden 250 ml LB-Flüssigmedium in einem Erlenmeyerkolben (1 l) mit einer, für etwa 16 Stunden bei 37°C vorkultivierten, Bakterienkultur inokuliert. Nach Kultivierung bei 37°C und 250 UpM bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 wurde die Kultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 3.000 x g und 4°C für 15 Minuten. Es wurde dreimal mit je 50 ml eiskaltem sterilen Wasser gewaschen. Hierfür wurden die Zellen zunächst resuspendiert und anschließend bei 3.000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Ein abschließender Waschschrift wurde mit 5 ml kaltem 10 % (V/V) Glycerin durchgeführt. Die Zellen wurden in 1,25 ml eiskalter Glycerinlösung (10 % (V/V)) resuspendiert und zu jeweils 80 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Bei der Verwendung chemisch kompetenter Bakterienzellen erfolgte die Transformation mittels Hitzeschock [147]. Zu 100 µl auf Eis aufgetauten Zellen wurden 5 - 10 µl Ligationsansatz oder 1 - 2 µl Vektor-DNA (mindestens aber 25 ng) gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis folgte eine Temperaturerhöhung auf 42°C für 60 Sekunden im Wasserbad (HAAKE V15, Thermostat HAAKE DC10). Die Zellen inkubierten im Anschluss weitere zwei Minuten auf Eis. Vor der Regenerationsphase bei 37°C und 230 UpM für eine Stunde wurde der Transformationsansatz mit 400 µl SOC-Medium vermischt. Für die Selektion wurden 20 - 100 µl ausgestrichen. Im Fall von Ligationsansätzen wurde der gesamte Transformationsansatz ausgestrichen.

Für die Transformation elektrokompenter Bakterienzellen [154] wurden 80 µl dieser Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 - 2 µl Vektor-DNA oder 2 - 10 µl mittels „GeneJET™ PCR Purification Kit“ entsalztem Ligationsansatz vermischt. Die Lösung wurde in eine eiskalte Elektroporations-Küvette (0,1 mm Elektrodenabstand, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem Einzelimpuls von 1,8 kV und ~ 5 ms (MicroPulser™ Programm „Ec1“, Bio-Rad Laboratories GmbH). Anschließend wurde dem An-

satz 1 ml SOC-Medium hinzugegeben. Die Regenerationsphase bei 37°C und 230 UpM betrug zwischen 45 und 60 Minuten. Zur Selektion wurden 20 - 50 µl des Ansatzes ausgestrichen. Abweichend von der beschriebenen Durchführung wurden je 5 µl der vorbereiteten Vektor-DNA aus der ITCHY-Technik (Kapitel 2.3.3) mit 80 µl Bakterienzellen elektroporiert und im Anschluss mit 400 µl SOC-Medium vermischt. Nach der Regenerationsphase von 30 Minuten wurde die gesamte Bakterienlösung zu je 25 µl ausgestrichen.

Die Selektion der Transformanten erfolgte durch die Kultivierung der Zellen auf LB-Festmedium mit entsprechenden Antibiotika bei 37°C für etwa 16 Stunden.

2.2.7 Herstellung von Dauerkulturen zur Langzeitlagerung von Bakterienstämmen

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen wurden 750 µl einer LB-Flüssigkultur, welche bei 37°C für etwa 16 Stunden kultiviert wurde, mit 250 µl autoklaviertem LB-Medium nach Miller mit 60 % (V/V) Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

2.2.8 PCR

Die PCR [155, 156] erfolgte mit einem der Thermocycler TProfessional Basic oder Gradient (Biometra GmbH, Göttingen). Die Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes und Temperaturprogramms sind in Tabelle 2.5 angegeben. Das Programm wurde abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden, Matrizen und DNA-Polymerasen zur Herstellung der in Tabelle 2.6 gezeigten Konstrukte angepasst. Bei der „*One-pot fusion polymerase chain reaction for combinatorial synthesis of DNA from several cassettes*“ [143] (kurz „*One-pot fusion*“-PCR (Kapitel 2.3.2)) enthielt der Reaktionsansatz zwei Matrizen mit je zwei flankierenden Oligonukleotiden sowie ein zusätzliches Fusions-Oligonukleotid. Die Produkte der PCR wurden gelelektrophoretisch analysiert. Nach Gelextraktion wurden die PCR-Fragmente mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 2.2.9) und mit dem vorbereiteten Vektor ligiert (Kapitel 2.2.10 und 2.2.11).

Tabelle 2.5: Reaktionsansatz und Temperaturprogramm für die Standard-PCR.

Komponente	Gehalt	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Zyklusanzahl
Matrize	100 - 150 ng	Initiale Denaturierung	95	05:00	1
P#for ¹⁾	0,2 pmol* μl^{-1}	Denaturierung	95	00:30	} 34
P#rev ¹⁾	0,2 pmol* μl^{-1}	Hybridisierung	⁵⁾	00:30	
dNTPs	0,4 mM	Elongation	72	⁶⁾	
Puffer	1 x	Abschließende Elongation	72	5:00	1
Polymerase	0,5 U ²⁾ / 1,25 U ³⁾	Pause	16	∞	∞
H ₂ O	ad Volumen ⁴⁾				

¹⁾ Oligonukleotide aus Tabelle 2.4; ²⁾ Phusion DNA-Polymerase oder ³⁾ DreamTaq-/Taq DNA-Polymerase; ⁴⁾ Das gewählte Endvolumen war abhängig von dem weiteren experimentellen Vorgehen; ⁵⁾ Die Hybridisierungstemperatur wurde in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide angepasst; ⁶⁾ Die Elongationszeit wurde der entsprechenden Syntheserate der eingesetzten DNA-Polymerase und der zu amplifizierenden Basenpaare angepasst.

Tabelle 2.6: Mit Standard-PCR erzeugte Konstrukte.

Konstrukt	Matrize	Oligonukleotide	Hybridisierungstemperatur [°C]
pET15b_AS _{fulllength}	pQE-2_AS	P1/P7	54,2
pET15b_GalT _C	pMA-T-GalT _C	P4/P6	62,7
pET15b_ASGalT_Bib	pET15b_AS _{fulllength}	P1/P8	61,0
	pET15b_GalT _{fulllength}	P3/P4	59,1

2.2.9 Restriktion von DNA-Amplifikaten

Für die Ligation in einen Vektor wurde das DNA-Amplifikat mittels „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ gereinigt und in 30 μl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst. Anschließend wurde der Ansatz mit den Restriktionsendonukleasen bei 37°C für eine Stunde in einem Heizblock (Model TH 21, HCL BioTech, Bovenden) inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden so gewählt, dass die DNA zeitgleich mit zwei Enzymen verdaut wurde. 30 μl DNA-Lösung wurden mit je 2 μl „FastDigest“ Enzyme (Tabelle 2.7) und 1x „FastDigest“- oder 1x „FastDigest Green“-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben thermisch inaktiviert. Die DNA-Lösung wurde direkt mit linearisierter und dephosphorylierter Vektor-DNA ligiert oder bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.7 Restriktionsenzyme für PCR-Amplifikate.

Fragment		Restriktionsendonuklease		Konstrukt
Name	Größe [bp]	1	2	
AS _{fulllength}	1.413	<i>NdeI</i>	<i>BamHI</i>	pET15b_AS _{fulllength}
GalT _C	645	<i>BamHI</i>	<i>XhoI</i>	pET15b_GalT _C
AS ¹⁾	792	<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	pET15b_ASGalT_Bib
GalT _C	648	<i>BamHI</i>	<i>XhoI</i>	
AS _{X+Y} GalT	1.347 - 1.353	<i>NdeI</i>	<i>BamHI</i>	pET15b_AS _{X+Y} GalT

¹⁾ Nur die N-terminale Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase.

2.2.10 Restriktion und Dephosphorylierung des Vektors pET15b

Für die Konstrukte pET15b_AS_{fulllength}, pET15b_ASGalT_Bib und pET15b_AS_{X+Y}GalT wurden 5 µg DNA des Leervektors pET15b mit je 5 µl *BamHI* und *NdeI* „FastDigest“-Restriktionsendonukleasen in 1x „FastDigest“- oder 1x „FastDigest Green“-Puffer bei 37°C für mindestens eine ¾ Stunde bis maximal einer Stunde verdaut. Die Restriktion von 1,5 µg Leervektor für die Konstruktion des Vektors pET15b_GalT_C erfolgte zunächst mit 10 U *XhoI* in 2x Tango-Puffer bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 10 U *BamHI* und 2x Tango-Puffer hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende Dephosphorylierung mit 10 U einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase („FastAP“, Thermo Fisher Scientific) in 1x „FastDigest“- oder „FastDigest Green“-Puffer erfolgte bei 37°C für 30 Minuten. Die vorbereitete Vektor-DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, aus dem Gel mittels „GeneJET™ Gel Extraction Kit“ extrahiert, in 25 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst und direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.11 Ligation

Für die konventionelle Klonierung wurden vorbereitete Vektor-DNA und vorbereitete DNA-Fragmente in einem Verhältnis von 1:6 bis 1:8 (V/V) miteinander vermischt. Die Ligation erfolgte in 1x Ligasepuffer (mit 0,5 mM Adenosintriphosphat) und 5 U T4-DNA-Ligase, bei 4°C für etwa 18 Stunden. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz (10 - 15 µl) in chemisch kompetente *E. coli* XL1blue Zellen transformiert. Für die Transformation elektrokompenter Zellen wurde der Ligationsansatz mittels „GeneJET™ PCR Purification Kit“ gereinigt.

2.2.12 Analytischer Restriktionsverdau

Für die Restriktionsanalyse wurden 3 µl Vektor-DNA mit je 0,5 µl Restriktionsenzymen und 1x „FastDigest“- oder 1x „FastDigest Green“-Puffer vermischt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde dieser Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.13 DNA Sequenzierung

Die nach den Angaben der Anbieter vorbereitete DNA wurde an GATC Biotech AG oder Eurofins Genomics versandt und dort nach Sanger [157] mit bereitgestellten Oligonukleotiden (Tabelle 2.8) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Software Chromas LITE (Version 2.1.1, Technelysium Pty. Ltd., Australien) und MultAlin [158] bearbeitet und ausgewertet.

Tabelle 2.8: Oligonukleotide zur Sequenzierung.

^E Eurofins Genomics (Ebersberg), ^G GATC Biotech AG (Konstanz),

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
T7 ^{E & G}	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term ^E	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
pET-RP ^G	CTAGTTATTGCTCAGCGG

2.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt [159]. In Tabelle 2.9 ist die Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele angegeben. Als Standard wurde ein Gemisch aus sieben Proteinen mit unterschiedlichen Massen von 14,4 kDa bis 116,0 kDa verwendet („Unstained Protein Molecular Weight Marker“, Thermo Scientific Molecular Biology, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von etwa 100 V in SDS-Laufpuffer in einer Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® 3 Cell System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt.

Die für die Gelelektrophorese verwendeten Proteinproben wurden mit $\frac{1}{3}$ Volumen 3x Probenpuffer versetzt und für etwa 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Vor dem Auftragen auf das Gel kühlten die Proben kurz auf Eis. Nach der Trennung wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau-G250 gefärbt [160, 161]. Hierfür wurde das Trenngel für etwa 16 Stunden in circa 30 ml Färbelösung bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Das Entfärben des Hintergrundes für eine deutliche Darstellung der Proteine geschah in zwei aufeinander folgenden Schritten. Das gefärbte Gel wurde zunächst in etwa 30 ml Entfärber-Lösung I gegeben und für circa 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Diese Lösung

wurde gegen 30 ml Entfärber-Lösung II ausgetauscht und ebenfalls für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Im Anschluss wurden die Gele in H₂O gelagert. Die Gele wurden zur Dokumentation entweder zunächst zwischen zwei Cellophan-Blättern (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) in einem Rahmen bei Raumtemperatur getrocknet oder direkt digitalisiert.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung für 10,5 %-ige Polyacrylamidgele mit 0,75 mm Stärke.

	Sammelgel	Trenngel
0,5 M Tris pH 6,8	1,25 ml	---
1,5 M Tris pH 8,8	---	2,50 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8 %)	0,75 ml	3,50 ml
H₂O	3,00 ml	3,85ml
<hr/>		
10 % (m/V) SDS	50,00 µl	100,00 µl
10 % (m/V) APS	15,00 µl	50,00 µl
TEMED	5,00 µl	5,00 µl

APS, Ammoniumperoxodisulfat; TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris, 0,19 M Glycin und 0,1 % (m/V) SDS in H₂O

3x Probenpuffer

0,2 M Tris pH 6,8, 32 % (V/V) Glycerol, 6,4 % (m/V) SDS, 0,14 % (m/V) Bromphenolblau und 150 mM Dithiotreitol (DTT) in H₂O

Färbelösung

50 % (V/V) Methanol, 10 % (V/V) Essigsäure und 0,5 g*L⁻¹ Coomassie-Brilliant-Blau-G250 in H₂O

Entfärber-Lösung I

50 % (V/V) Ethanol und 10 % (V/V) Essigsäure in H₂O

Entfärber-Lösung II

16,5 % (V/V) Ethanol und 5,0 % (V/V) Essigsäure in H₂O

2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test

Für die quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach der Aufreinigung von His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase wurde der Bradford-Test verwendet [162]. Dazu wurde die Proteinlösung mit Wasser verdünnt (Gesamtvolumen 20 µl) und mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Der Reaktionsansatz wurde für zehn Minuten abgedunkelt bei Raumtemperatur in einer Mikroplatte inkubiert (MIKROPLATTE, 96 Näpfe, PS, ELISA, MICROLON 200, „medium binding“, U-Boden, glasklar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im Mikroplatten-Photometer der Firma Tecan (Lesemodus normal, Schütteldauer

(innen) 5 Sekunden, Software: XFluor4 V 4.51, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim). Als Referenz diente ein Reaktionsansatz, der anstatt Proteinlösung Wasser enthielt.

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurden statt der Probenlösungen 20 µl Rinderse-
rumalbumin (BSA-Lösung von 0,00 bis 0,15 mg*ml⁻¹ in Extraktionspuffer) wie oben angege-
ben behandelt. Die mittels linearer Regression erhaltene Geradengleichung wurde zur Er-
mittlung der Proteinkonzentration verwendet.

Bradford-Reagenz

0,1 g*L⁻¹ Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (V/V) 85 % Phosphorsäure und 5 % (V/V)
95 % Ethanol, vor Gebrauch filtriert.

2.3 Herstellung von Expressionskonstrukten

2.3.1 OE-PCR

In der OE-PCR wurde das gesamte Plasmid pET15b_GalT_{fulllength} ausgehend von einem zu-
vor erzeugten Megaoligonukleotid amplifiziert. Um das Megaoligonukleotid (GalT_N) zu erhal-
ten, wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden P2/P5 (Tabelle 2.4) und pMA-T_GalT_N (Tabelle
2.3) als Matrize durchgeführt. Die Produkte aus verschiedenen PCR-Reaktionen (Hybridisie-
rungstemperatur 52,4°C bis 60,8°C) wurden nach der Aufreinigung aus dem Agarosegel
(Kapitel 2.2.2) vereinigt und als Oligonukleotid zur Amplifikation von pET15b_GalT_C einge-
setzt (Tabelle 2.10). pET15b_GalT_C wurde aus pMA-T_GalT_C durch Vervielfältigung der cDNA
(P6/P4, Tabelle 2.4) und Ligation in *Bam*HI/*Xho*I verdauten pET15b erhalten.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung und PCR-Programm der OE-PCR.

Komponente	Gehalt	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Anzahl der Zyklen
pET15b_GalT _C	3 - 30 ng	Initiale Denaturierung	98	02:00	1
GalT _N -Megaoligo- nukleotid	250x ¹⁾	Denaturierung	98	00:30	} 25
dNTPs	0,4 mM	Hybridisierung	60	00:30	
Phusion HF Puffer	1x	Elongation	72	10:00	
Phusion DNA-Poly- merase	1,0 U	Abschließende Elongation	72	10:00	1
H ₂ O	ad 10 µl	Pause	12	∞	∞

¹⁾ molarer Überschuss an DNA-Fragment

Für den Abbau des als Matrize eingesetzten Vektors wurde der Reaktionsansatz im An-
schluss mit 10 U *Dpn*I versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgte die Transfor-

mation des gesamten Ansatzes in *E. coli* XL1blue. Die aus einem Klon gewonnene Plasmid-DNA wurde mit einem T7-Oligonukleotid sequenziert.

2.3.2 “One-pot fusion“-PCR zur Konstruktion synthetischer $AS_{X+Y}GalT$ Fusionsgene

Mit dieser Technik ist es möglich auf schnelle und einfache Art, Fragmente unterschiedlicher Matrizen in einer einzelnen PCR miteinander zu fusionieren [143]. Der Reaktionsansatz und das zugehörige PCR-Programm sind in Tabelle 2.11 aufgeführt. Für die unterschiedlichen Fusionspunkte wurde ein jeweils zugehöriges Fusions-Oligonukleotid (P9 -P28, Tabelle 2.4) verwendet.

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz und PCR-Programm zur Amplifikation rationeller $AS_{X+Y}GalT$ -Gene mittels der „One-pot fusion“-PCR

Komponente	Gehalt	“One-pot fusion“-PCR			
		Schritt	Temp. [°C]	Zeit [min:s]	Anzahl der Zyklen
pET15b_AS _{fulllength}	1 µg*µl ⁻¹	Initiale Denaturierung	98	2:00	1
pET15b_GalT _{fulllength}	1 µg*µl ⁻¹	Denaturierung	98	0:15	} 34
AS-NdeI_for	0,2 µmol	Hybridisierung	60	0:20	
GalT-Bam_S_rev	0,2 µmol	Elongation	72	1:00	
Fusions-Oligonukleotid	0,02 µmol				
dNTPs	0,4 mM	Abschließende Elongation	72	5:00	1
Phusion HF Puffer	1x	Pause	16	∞	∞
Phusion DNA-Polymerase	0,4 U				
H ₂ O	ad 25 µl				

2.3.3 Herstellung von Expressionskonstrukten für chimäre ASGalT-cDNAs mittels ITCHY-Technik

Mit dem schrittweisen Abbau von DNA unter Verwendung der Exonuklease III ist es möglich, Bibliotheken von chimären Genen zu generieren, die theoretisch alle Kombinationsmöglichkeiten in ihrer Sequenz abdecken (ITCHY-Technik [95, 100]). Die Durchführung kann in drei Schritte gegliedert werden:

1. Linearisierung von pET15b ASGalT Bib durch *XhoI*-Verdau: Für die Konstruktion der rekombinanten Glykosyltransferase aus der N-terminalen Hydrochinon-Glycosyltransferase-Domäne und der C-terminalen Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase-Domäne wurden zunächst 20 µg von pET15b_ASGalT_Bib für sechs Stunden bei 37°C mit 50 U *XhoI* in 1x Puffer R verdaut. Die mit „GeneJET™ PCR Purification Kit“ gereinigte DNA wurde in 70 µl 1x Exo-

nuklease III-Puffer eluiert und auf 11°C in einem Heizblock (Model TH 21, HLC BioTech, Bovenenden) temperiert.

2. Bearbeitung durch Exonuklease III und S1-Nuklease: Mit Zugabe von 100 U Exonuklease III wurde die Verkürzung der linearisierten DNA gestartet. Eine Probennahme von 2 µl erfolgte alle 20 Sekunden über einen Zeitraum von zehn Minuten. Jede Einzelprobe wurde mit 6 µl eisgekühltem S1-Nuklease-Mix vermischt und für 30 Minuten bei 22°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte nach Zugabe von 2 µl Stopp-Lösung durch thermische Inaktivierung für zehn Minuten bei 70°C. Alle Proben wurden im Anschluss vereint, mit dem „GeneJET™ PCR Purification Kit“ gereinigt und in 30 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 eluiert.

3. Zyklisierung durch Ligase: Die Lösung wurde zu je 10 µl aliquotiert und für circa 18 Stunden bei 4°C mit 5 U T4-DNA-Ligase in 1x T4-DNA-Ligasepuffer und 5 % (V/V) Polyethylenglycol 4000 ligiert. Die Ligationsansätze wurden im Anschluss zusammengegeben und vor der Elektroporation mittels „GeneJET™ PCR Purification Kit“ gereinigt. Die Elution erfolgte nach einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit 30 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5.

S1-Nuklease-Mix

2 U*µl⁻¹ S1-Nuklease in 1x S1-Nuklease Reaktionspuffer

Stopp-Lösung

300 mM Tris, 50 mM EDTA

2.4 Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen in Schüttelkolben

2.4.1 Heterologe Expression

Die mit den Expressionskonstrukten transformierten *E. coli* ArcticExpress (DE3) wurden zunächst für 16 Stunden bei 37°C und 250 UpM in einer Vorkultur angezogen. Dazu wurden 15 ml Medium (Tabelle 2.12) mit Antibiotika in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die Hauptkulturen wurden in TB-Medium oder LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben von 1 l angesetzt (Tabelle 2.12), indem die Ansätze so mit Vorkultur versehen wurden, dass die OD₆₀₀ etwa 0,15 betrug. Bei Erreichen einer bestimmten OD₆₀₀ erfolgte ein Temperaturangleich auf 22°C und der Zusatz von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; Tabelle 2.12). Nach 18 bis 20 Stunden bei 22°C und 250 UpM wurden die Zellen bei 3.500 UpM (Beckman Coulter GS-6R, Rotor GH3.8) und 4°C für 10 - 15 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden bei -20°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert oder direkt für den Zellaufschluss verwendet.

Tabelle 2.12: Bedingungen für die Proteinproduktion in Schüttelkolben.

	His ₆ -Hydrochinon-Glucosyltransferase	His ₆ -Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase
Vorkultur	TB-Medium	LB-Medium
Hauptkultur	100 ml TB-Medium	200 ml LB-Medium
OD₆₀₀	0,5 bis 0,8	0,4 bis 0,6
IPTG	20 µM	5 µM

2.4.2 Zellaufschluss

Zellaufschluss A: Für die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase wurde das in der Literatur beschriebene Protokoll [108] verändert. Zellpellets der Expression wurden direkt verwendet oder nach Lagerung bei -20°C langsam aufgetaut. Zunächst wurde das Pellet in 1 ml Extraktionspuffer I pro 100 ml Kulturansatz vollständig resuspendiert und anschließend zu 1 mg*ml⁻¹ mit Lysozym versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension mit Ultraschall behandelt (Ultraschallgenerator von Branson SONIFIER 250, „Duty Cycle“ 30 %, „Output Control“ 2,0 (EMERSON Technologies GmbH & Co. OHG, Dietzenbach). Das Verfahren wurde dreimal mit einem Intervall von 45 Sekunden Anwendung und 45 Sekunden Pause auf Eis durchgeführt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für 45 Minuten entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert.

Extraktionspuffer I

50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 20 mM β-Mercaptoethanol

Zellaufschluss B: Für die His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase wurde das in der Literatur beschriebene Protokoll [112] verwendet. Das Zellpellet wurde anfangs entweder langsam aufgetaut oder direkt nach der Zellernte verarbeitet. Die Zellmasse wurde pro Gramm mit 2 ml Extraktionspuffer II versetzt und bei 12°C und 120 UpM für etwa zehn Minuten inkubiert. Im Folgenden wurden die Zellen durch wiederholtes Pipettieren vollständig resuspendiert. Diese Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und für fünf Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach der Zugabe von MgCl₂ zu 5 mM und DNase I zu 0,1 mg*ml⁻¹ folgte eine Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für fünf Minuten entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C gelagert.

Extraktionspuffer II

100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 [146], 500 mM KCl, 10 mM Imidazol, 1 % (V/V) Triton X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 2,0 mg*ml⁻¹ Lysozym

2.4.3 Affinitätschromatographische Anreinigung

Das aus dem Zellaufschluss A erhaltene Lysat mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase wurde mit 100 µl 50 % (m/V) Ni²⁺-NTA-Lösung/ml vermengt und für eine Stunde bei 4°C im Rotationsmischer (Multi Bio RS-24, BIOSAN (Riga, Litauen)) unter kreisförmiger Umdrehung von 10 UpM inkubiert. Die Ni²⁺-NTA-Matrix wurde zuvor mit Extraktionspuffer I äquilibriert. Die Suspension wurde auf eine Säule (Poly-Prep, 30 µm Polyethylen-Fritte, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gegeben und zweimal mit zwei Säulenvolumen Extraktionspuffer I mit 20 mM Imidazol gewaschen. Zwei weitere Waschschrirte mit zwei Säulenvolumen Extraktionspuffer I mit 50 mM Imidazol wurden angeschlossen. Daran folgten vier Elutionsschrirte mit 1½ Säulenvolumen mit Extraktionspuffer I mit 250 mM Imidazol. Alternativ wurde diese Aufreinigung in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit Zentrifugationsschrirten bei 4°C und 10.000 x g für jeweils eine Minute durchgeführt. Die Fraktionen wurden bei 4°C gelagert.

Das aus dem Zellaufschluss B erhaltene Lysat mit His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase wurde mit 75 µl 50 % (m/V) Ni²⁺-NTA Lösung/ml vermengt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Rotationsmischer unter kreisförmiger Umdrehung von 10 UpM inkubiert. Die Matrix wurde zuvor mit Puffer A äquilibriert. Die Aufreinigung wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit Zentrifugationsschrirten bei Raumtemperatur von je 30 Sekunden und 6.000 x g durchgeführt. Die Matrix wurde zweimal mit je 600 µl Puffer A mit 20 mM Imidazol gewaschen. Es wurde viermal mit je 75 µl Puffer A mit 200 mM Imidazol eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden bei 4°C gelagert.

Puffer A

50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 8,0 [146], 300 mM NaCl und 1 % (V/V) Triton X-100

2.5 Produktion rekombinanter Glykosyltransferasen in Mikroplatten

2.5.1 Heterologe Expression

Die Kultivierung von transformierten *E. coli* ArcticExpress (DE3) erfolgte in Mikroplatten (MIKROPLATTE, 96 Npfe, PS, ELISA, MICROLON 200, „medium binding“, U-Boden, glasklar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Pro Napf wurden 200 μ l TB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert. Für alle Inkubationsschritte während der Kultivierung wurden die Platten mit einer gasdurchlässigen Folie verschlossen (Verschlussfolie für Zell-/Gewebekulturen aus Rayon, BRAND GmbH und Co. KG, Wertheim). Die Platten wurden für 16 Stunden in einem Schüttelinkubator (Minitron, INFORS-HAT, Einsbach) bei 37°C, 250 UpM inkubiert. Mit 1,5 - 2,0 μ l dieser Bakteriensuspension wurden weitere 200 μ l TB-Medium inokuliert und bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 - 0,8 bei 37°C, 250 UpM kultiviert und dann auf eine Temperatur von 22°C gekühlt. Nach Induktion mit IPTG (Tabelle 2.13) erfolgte die Kultivierung zur Genexpression bei 22°C für 20 Stunden. Die OD₅₉₅ wurde im Mikroplatten-Photometer („Microplate Reader“ Sunrise™, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) mit folgenden Einstellungen bestimmt: Lesemodus normal, Schütteldauer (innen) zehn Sekunden.

Tabelle 2.13: Konzentration von IPTG zur Induktion der Proteinproduktion bei Kultivierung in Mikroplatten.

Konstrukt	IPTG
pET15b_AS _{fulllength}	20 μ M
pET15b_GalT _{fulllength}	5 μ M
pET15b	20 μ M
pET15b_ASGalT_Bib	20 μ M
pET15b_ASGalT _{Chim}	20 μ M
pET15b_AS _{X+Y} GalT	20 μ M

2.5.2 Zellaufschluss

Für die Herstellung der Gesamtproteinextrakte wurden die in Mikroplatten hergestellten Bakteriensuspensionen mit 2.500 x g bei Raumtemperatur für 30 Minuten zentrifugiert (Rotor A-4-81 (MTP) mit „Flex bucket retrofit set“, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 50 μ l Extraktionspuffer III pro Napf aufgenommen. Die Mikroplatte wurde mit einer Verschlussmatte abgedeckt (Verschlussmatte aus Polypropylen für 0,5 ml Mikroplatte, 96 Npfe, BRAND GmbH und Co. KG, Wertheim) und für 30 Minuten bei 22°C, 150 UpM im Schüttelschrank (Minitron, INFORS-HAT, Einsbach) inkubiert. Der nach einer 45-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 2.500 x g erhaltene Gesamtproteinextrakt wurde in eine neue Mikroplatte überführt und ein Teil direkt für die Nachweisreak-

tion verwendet. Unverbraucher Extrakt wurde bei 4°C gelagert. Vor der Zellernte wurden wenige Mikroliter der Bakteriensuspension verwendet, um 200 µl TB-Medium für eine „Stamm-Sicherung“ zu inokulieren. Diese Kultur wurde für 16 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37°C, 250 UpM inkubiert und im Anschluss bei 4°C gelagert.

Extraktionspuffer III

50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 % (V/V) Triton X-100, 1 mg*ml⁻¹ Lysozym, 0,1 mg*ml⁻¹ DNase I, ¹/₁₀ Volumen BugBuster und ein paar Kristalle PMSF.

2.6 Aktivitätsnachweis von Glykosyltransferasen

2.6.1 Nachweis der pH-Änderung

2.6.1.1 Proteinextrakt

Die aus dem Reaktionsmechanismus der Glykosyltransferasen resultierende Verschiebung des pH-Wertes des Reaktionsgemisches und die damit verbundene Änderung der Absorption des Indikators Bromthymolblau wurde spektrophotometrisch verfolgt. Zur Aktivitätsbestimmung mit Bromthymolblau wurden 2 - 8 µl des Gesamtproteinextraktes mit 2 mM Hydrochinon in einem Gesamtvolumen von 100 µl 2 mM Tris/HCl pH 7,0 in Gegenwart von 0,11 mM Bromthymolblau (Bromthymolblau-Indikatorlösung, Kapitel 2.1.3) in Mikroplatten im Mikroplatten-Photometer bei 37°C temperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Zuckerdonors (Endkonzentration 2 mM) gestartet. Die Absorption bei 430 nm wurde in einem Intervall von fünf Minuten über 60 Minuten oder in einem Intervall von zehn Minuten über 120 Minuten im Mikroplatten-Photometer mit folgenden Einstellungen bestimmt: Lesemodus normal, Schütteldauer (innen) drei Sekunden, einmalig vor der Messung, Temperatur 37°C. Als Kontrollen wurden Extrakte aus mit dem Leervektor transformierten *E. coli* oder der Überstand hitzedenaturierter Proteine (95°C für mindestens 15 Minuten) untersucht.

2.6.1.2 Koloniescreening

2.6.1.2.1 Filterpapier

E. coli ArcticExpress (DE3) und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wurde mit pQE-2_AS, pET15b_AS_{fulllength}, pET15b_ASGalT_{Chim} oder pET15b transformiert. Die Kultivierung erfolgte auf selektivem LB-Festmedium pH 7,4 mit 0,05 mM Kresolrot (Kresolrot-Indikatorlösung I, Kapitel 2.1.3) und 0,01 mM IPTG oder 0,01 mM Bromthymolblau (Bromthymolblau-Indikatorlösung, Kapitel 2.1.3) und 0,02 mM IPTG bei 37°C für etwa 16 Stunden. Die Bakterienkolonien wurden durch das Auflegen und Andrücken auf steriles Filterpapier (MN615 (No. 1), Porengröße 4 - 12 µm (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren) transferiert.

Die Filter wurden anschließend in 1,5 - 2,0 ml Substratlösung I oder II entweder eingelegt oder nur kurz eingetaucht und in eine weitere Petrischale überführt. Die Filter wurden in offenen Petrischalen in einem Hybridisierungsofen (Hybridisierungsofen/-schüttler SI 20H, Stuart Scientific) bei 37°C für fünf bis sechs Stunden inkubiert. Die Auswertung der Filter erfolgte visuell.

Substratlösung I

50 mM Kresolrot, 2 mM Zuckerakzeptor, 10 mM UDP-Glucose, pH 7,4 (HCl)

Substratlösung II

0,8 mM Bromthymolblau, 2 mM Hydrochinon, 10 mM Zuckerdonor, pH 7,4 (HCl)

2.6.1.2.2 Flüssigkultur

Für die Vorkultur wurden 2,5 ml LB-Medium (nach Lennox) mit 0,04 mM Bromthymolblau mit 1 µl Dauerkultur von transformierten *E. coli* ArcticExpress (DE3) inokuliert und für etwa 16 Stunden im Schüttelschrank bei 37°C und 230 UpM (Minitron, INFORS-HAT, Einsbach) kultiviert. 2 ml des oben genannten Mediums mit 2 mM Hydrochinon und 10 mM UDP-Glucose wurden mit 250 - 500 µl der Vorkultur des zu untersuchenden Stammes inokuliert. Nach Zugabe von 0,02 mM IPTG erfolgte die Kultivierung für drei Stunden bei 37°C entweder ruhend oder schüttelnd bei 230 UpM.

2.6.2 Nachweis spezifischer Glykoside

2.6.2.1 Enzymreaktion für die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase

Für die Enzymreaktion mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase wurden circa 10 µg Gesamtprotein der Elutionsfraktion oder des Gesamtproteinextraktes verwendet. Der Reaktionsansatz von insgesamt 63,8 µl enthielt daneben 2 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM UDP-Glucose und 2 mM Hydrochinon. Die Inkubation wurde in einem Heizblock (Model TH 21, HCL Bio-Tech GmbH, Bovenden) bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 300 µl 100 % Methanol versetzt und bei 18.000 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in Injektionsfläschchen überführt und für die HPLC verwendet. Abweichend wurde die Enzymreaktion in Mikroplatten mit 10 µl Gesamtproteinextrakt wie unter 2.6.2.3 beschrieben durchgeführt.

2.6.2.2 Enzymreaktion für die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase

Es wurden 5 µl Elutionsfraktionen oder 10 µl Gesamtproteinextrakt der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase für die Enzymreaktion eingesetzt. Der Reaktionsansatz von insgesamt 60 µl enthielt daneben Assaypuffer sowie 1 mM UDP-Galactose und 0,5 mM Kämpferol. Die Inkubation wurde in einem Heizblock (Model TH 21, HCL BioTech GmbH, Boven- den) bei 43°C für 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 100 µl 100 % Methanol versetzt und bei 18.000 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in Injektionsfläschchen überführt und für die HPLC verwendet. Abweichend wurde die Enzymreaktion in Mikroplatten mit 10 µl Gesamtproteinextrakt wie unter 2.6.2.3 beschrieben durchgeführt.

Assaypuffer

50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % (V/V) Glycerol

2.6.2.3 Enzymreaktion von Glykosyltransferasen in Mikroplatten

Die Enzymreaktion mit Gesamtproteinextrakten (10 µl) wurde in verschlossenen Mikroplatten (Polypropylen-Matte für 0,5 ml Mikroplatten, 96 Näpfe, Brand, Wertheim) durchgeführt. Zusätzlich wurden Gesamtproteinextrakt-Pools von insgesamt 30 µl verwendet. Für die Enzymreaktion chimärer Glykosyltransferasen wurden ebenso drei Gesamtproteinextrakte von je 10 µl vereint und in Assaypuffer (Kapitel 2.6.2.2) mit 2 mM Zuckerdonor und 2 mM Hydrochinon in einem Gesamtvolumen von 60 µl vermischt. Die Reaktionsansätze wurden bei 43°C für 60 Minuten inkubiert (Minitron, INFORS-HAT, Einsbach). Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 120 µl 100 % Methanol versetzt und bei 2.500 x g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in Injektionsfläschchen überführt. Vor der Analyse mittels HPLC-Elektrospray-Ionisations (ESI)-MS/MS wurden die Proben mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase mit 60 % (V/V) Methanol 1:1.250 verdünnt. Proben chimärer Glykosyltransferasen und mit Vektorkontrolle wurden unverdünnt analysiert.

2.6.2.4 HPLC-DAD

Unter verwendung eines HPLC-Systems (1200 Series) von Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen) wurden 10 µl Probe auf einer Säule des Typs LiChrospher 100 RP-18e (4,6 mm*250 mm; WICOM GmbH, Heppenheim) mit einer Partikelgröße von 5 µm getrennt. Die Flussrate des gewählten Fließmittelgradienten (Tabelle 2.14) wurde auf konstant 1 ml*min⁻¹ eingestellt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser (pH 2,3 eingestellt mit Methansäure) verwendet. Mittels eines DAD wurden die Absorptionswerte

für p-Arbutin und Hydrochinon bei 285 nm und für Kämpferol bei 370 nm aufgezeichnet. Für die Auswertung der Daten wurde die Software „Agilent ChemStation for LC 3D systems“ (Version B.02.01-SR2, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) verwendet.

Als Referenzlösungen dienten $2,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ p-Arbutin und $2,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Hydrochinon in 60 % Methanol mit 2 mM Tris/HCl pH 7,5 oder mit 50 mM HEPES pH 7,5. Kämpferol wurde zu $0,14 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ und $0,29 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ in Methanol mit 1,0 % (V/V) Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Tabelle 2.14: HPLC-Gradient zum Nachweis von p-Arbutin und Hydrochinon bzw. Kämpferol.

Für den Nachweis von Hydrochinon wurde der Gradient für p-Arbutin verwendet.

Schritt	Gradient für p-Arbutin		Gradient für Kämpferol	
	Zeit [min:s]	Acetonitril, V/V [%]	Zeit [min:s]	Acetonitril, V/V [%]
1	00:00	2,0	00:00	2,0
	15:00	2,0	05:00	2,0
2	18:00	100,0	08:00	100,0
	23:00	100,0	13:00	100,0
3	26:00	2,0	20:00	2,0
	35:00	2,0	32:00	2,0

2.6.2.5 HPLC-ESI-MS/MS

Zur Identifizierung von p-Arbutin wurden die Massenübergänge m/z 271/101, m/z 271/108 und m/z 271/161 mit „multiple reaction monitoring“ (MRM) beobachtet. Die Bedingungen für die drei Übergänge wurden zunächst mit p-Arbutin automatisiert an einem Massenspektrometer (3200 QTrap LC-MS/MS System, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) mit der Reinsubstanz ($1,0 \mu\text{M}$) ermittelt (Tabelle 2.15). Diese wurde dem Massenspektrometer mit einer Spritzenpumpe kontinuierlich mit $5,0 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$ über eine Vorsäule des Typs LiChrospher 100 RP-18, $5 \mu\text{m}$ ($20 \times 4 \text{ mm}$, WICOM GmbH, Heppenheim) zugeführt. Die Einstellungen von Gas, Temperatur und dem „declustering potential“ wurden unter Zufuhr von 50 % (V/V) Methanol/Wasser durch die HPLC-Anlage ($0,83 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) nachträglich manuell angepasst. Die Messungen erfolgten im negativen Modus in einer Elektrospray-Ionenquelle (Turbo V mit $-4,5 \text{ kV}$). Die Molekülionen tragen somit eine negative Ladung $[\text{M}-\text{H}]^-$. Zur Vernebelung wurde Stickstoff mit folgenden Einstellungen verwendet: „curtain gas“ 40, Gas 1 und 2 50. In der Kollisionszelle wurde das Ausgangsmolekül durch das „collisionally activated dissociation gas“ mit der Einstellung „Medium“ fragmentiert. Die Einstellungen der resultierenden Methode ohne chromatographische Trennung (Arbutin_3MRM) sind in Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16 dargestellt. Als mobile Phase wurde ein Ge-

misch aus bidestilliertem Wasser und Methanol (Tabelle 2.16) genutzt. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 10 µl.

Die Massenspektrometrie (Methode: Arbutin_3MRM_{Säule}; Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16) wurde zusätzlich mit einer Flüssigkeitschromatographie gekoppelt (HPLC-System 1200 Series, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen). Die verwendeten Säulen waren vom Typ LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (250*4,6 mm, WICOM GmbH, Heppenheim) oder Hypersil ODS C18, 5 µm (150*2,1 mm, MZ-Analysetechnik GmbH, Mainz). Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus bidestilliertem Wasser und Methanol (Tabelle 2.16) genutzt. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 50 µl. Die Software Analyst 1.4.2 / Mass Spectrometry Toolkit v3.3 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) diente der Gerätesteuerung und Datenauswertung.

Tabelle 2.15: Parameter für die ESI-MS/MS Methoden Arbutin_3MRM und Arbutin_3MRM_{Säule}

	m/z 271/108	m/z 271/161	m/z 271/101
Zeit [ms]	100,0	100,0	100,0
CE [eV]	-32,0	-12,0	-18,0
CEP [V]	-20,0	-20,0	-18,6
CXP [V]	-1,0	-1,0	-1,0
DP [V]	-45,0	-45,0	-45,0
EP [V]	-2,0	-2,0	-2,0

CE, "collision energy"; CEP, "cell entrance potential"; CXP, "collision cell exit potential"; DP, "declusterin potential"; EP, "entrance potential"

Tabelle 2.16: Gradienten der (HPLC-)ESI-MS/MS Methoden

ohne chromatographische Trennung (Arbutin_3MRM)				
Schritt	Zeit [min:s]	Flussrate [ml*min ⁻¹]	Methanol, V/V [%]	Ionenquelle [°C]
0	00:00	0,3	60	500
1	01:30	0,3	60	
mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM _{Säule})				
Schritt	Zeit [min:s]	Flussrate [ml*min ⁻¹]	Methanol, V/V [%]	Ionenquelle [°C]
0	00:00	0,83	2	530
1	04:00	0,83	2	
2	11:00	0,83	50	
3	15:00	0,83	100	
4	18:00	0,83	100	
5	19:00	0,83	2	
6	23:00	0,83	2	

3 ERGEBNISSE

3.1 Heterologe Expression und Nachweis der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase

Zunächst wurde der offene Leserahmen (ORF, engl. „open reading frame“) der Hydrochinon-Glucosyltransferase aus *Rauvolfia serpentina* (UniProtKB/Swiss-Prot Q9AR73) in den Vektor pET15b umkloniert. Hierfür wurde der ORF mit genspezifischen Oligonukleotiden (P1/P7, Tabelle 2.4) und der Matrize pQE-2_AS (Tabelle 2.3) in einer PCR amplifiziert. Nach dem Verdau des PCR-Produktes mit *Nde*I und *Bam*HI erfolgte die Ligation mit *Bam*HI/*Nde*I-verdaurem pET15b-Vektor. Nach der Plasmidisolierung des Vektors pET15b_AS_{fulllength} zeigte die Sequenzierung, dass der ORF ohne Mutationen in das Plasmid pET15b eingebracht wurde.

Zur Optimierung der anschließenden Expression der rekombinanten His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase in Schüttelkolben (Kapitel 2.4.1) wurden verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet (Tabelle 3.1). Die in der Tabelle 3.1 unter # 1 angegebenen Bedingungen eigneten sich, um die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (Kapitel 3.2) in *E. coli* zu exprimieren. Diese Expressionsbedingung wurde daher als Ausgangspunkt für die Expression im Mikrolitermaßstab und für die Expression der chimären Proteine gewählt. Die Analyse der Expression und Aufreinigung erfolgte mittels SDS-PAGE und Bradford-Test.

Tabelle 3.1: Getestete Kultivierungsdauer und -temperaturen zur Produktion der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase in Schüttelkolben.

#	Vorkultur		Hauptkultur		
			vor Induktion	nach Induktion	
	T [°C]	Zeit [h]	T [°C]	T [°C]	Zeit [h]
1	37	~16	37	22	~20
2	37	~16	37	37	~16
3	37	~16	37	12	~8
4	37	~16	37	12	~20
5	18	~72	18	10	~48

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Neben dem *E. coli* Gesamtproteinextrakt wurden der Durchlauf, die vier Waschfraktionen und die vier Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.1). Die Bande der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase mit einem Molekulargewicht von ~54,0 kDa (web. expasy.org/compute_pi/) war in den Elutionsfraktionen, nicht aber in den anderen Proben, deutlich erkennbar (Abbildung 3.1, Spuren 7-10). Diese Fraktionen enthielten weitere Proteine, die eine nicht homogene Reinigung belegen.

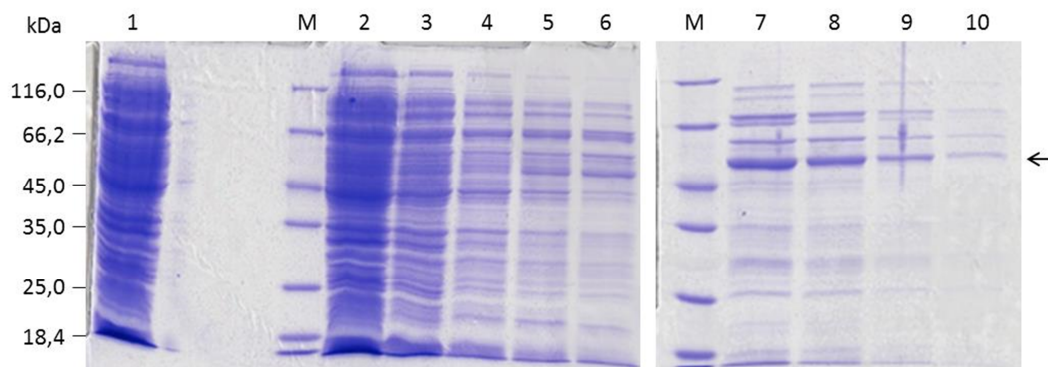


Abbildung 3.1: Elektrophoretische Trennung von Proteinlösungen nach der chromatographischen Aufreinigung der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase.

Die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase ($M_w \sim 54,0$ kDa, schwarzer Pfeil) wurde nach Expression in *E. coli* mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Aufgetragen wurden je 5 μ l folgender Proteinlösungen: **(1)** Gesamtproteinextrakt vor Chromatographie; **(2)** Durchlauf; **(3)-(6)** Waschfraktionen; **(7)-(10)** Elutionsfraktionen; **M**, 5,0 μ l Proteinmarker. Gezeigt ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel (10,5 %).

Für den qualitativen Nachweis enzymatischer Aktivität wurden der Gesamtextrakt und die Elutionsfraktionen mit Hydrochinon und UDP-Glucose inkubiert und das Reaktionsprodukt p-Arbutin (Hydrochinon-Glucosid) mittels HPLC-DAD nachgewiesen. Für die Identifizierung der Peaks standen sowohl Hydrochinon als auch p-Arbutin als Referenzsubstanzen zur Verfügung. Die Retentionszeit (R_t) von reinem p-Arbutin lag bei 6,7 Minuten und die von reinem Hydrochinon bei 8,4 Minuten (Abbildung 3.2 A Peak a und b). Im Chromatogramm der Enzymreaktionen wurde ein Peak mit einer R_t von 6,7 Minuten (Abbildung 3.2 B und D Peak a) gefunden. Dieser wurde dem p-Arbutin zugeordnet. Die Inkubation des Gesamtproteinextraktes einer Vektorkontrolle mit den Substraten als Negativkontrolle bestätigte, dass die Bildung von p-Arbutin auf die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase zurückzuführen ist (Abbildung 3.2 C). Die Peaks mit einer Retentionszeit von 3,2 Minuten und 4,5 Minuten konnten keiner Substanz zugeordnet werden. Die exemplarisch dargestellten Ergebnisse (Abbildung 3.2) zeigen den Nachweis in einem Reaktionsansatz mit 2 mM Tris/HCl, pH 7,5. Zudem wurden weitere Konzentrationen (1 - 100 mM, pH 7,0 - 7,5) und Natriumphosphat-

puffer (5 - 50 mM, pH 7,5) getestet. Alle Bedingungen führten zu ähnlichen Ergebnissen. Es wurde somit gezeigt, dass die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase zwar nicht homogen aufgereinigt wurde, jedoch unter allen untersuchten Bedingungen aktiv war.

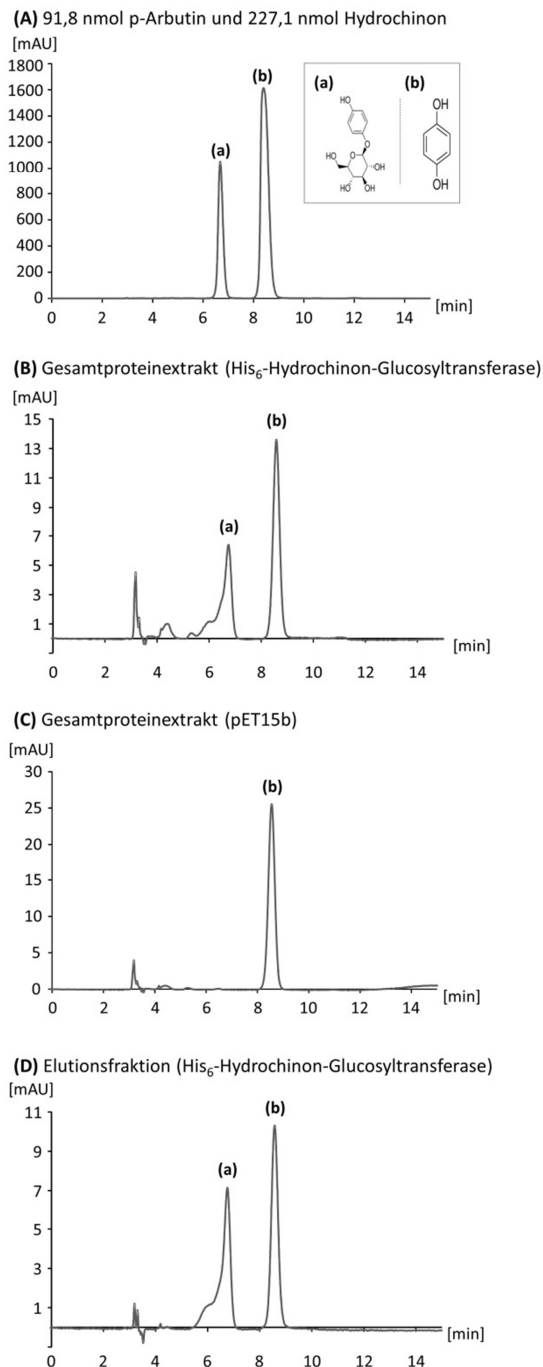


Abbildung 3.2: Qualitative Analyse der Umsetzung von Hydrochinon und UDP-Glucose durch die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase.

(A) Die Referenzsubstanzen p-Arbutin (a) und Hydrochinon (b) wurden in Methanol mit 2 mM Tris/HCl in H₂O, pH 7,5 gelöst und mit je 25 µg appliziert. **(B - C)** Proteinlösung (10 µg Gesamtprotein) wurde mit 2 mM Hydrochinon und 2 mM UDP-Glucose in 2 mM Tris/HCl pH 7,5 für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von Methanol und Zentrifugation wurde der Überstand mittels HPLC-DAD analysiert. Gezeigt sind HPLC-Chromatogramme für λ = 285 nm. **(B)** Gesamtproteinextrakt. **(C)** Negativkontrolle. **(D)** Elutionsfraktion 1 (10 µg).

3.2 Heterologe Expression und Nachweis der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase

Zunächst wurde ein pET15b-Vektor mit dem ORF der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase aus *Petunia x hybrida* (UniProtKB/Swiss-Prot Q9SBQ8)) konstruiert. Mittels Klonierung durch OE-PCR (Kapitel 2.3.1) wurde aus pET15b_GalT_C (Tabelle 2.3) und dem DNA-Fragment GalT_N der Vektor pET15b_GalT_{fulllength} (Tabelle 2.3) erzeugt. Nach Isolierung des Vektors pET15b_GalT_{fulllength} zeigte die Sequenzierung, dass der ORF ohne Mutationen in den Vektor pET15b eingebracht wurde.

Die Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase wurde in Schüttelkolben als His₆-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert (Kapitel 2.4.1). Im Anschluss wurde die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Kapitel 2.4.3). Der Durchlauf, die vier Wasch- und die vier Elutionsfraktionen wurden gesammelt. Die Proteine ausgewählter Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.3). Die Anreicherung der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase mit einem Molekulargewicht von ~49,7 kDa (web.expasy.org/compute_pi/) ist in den untersuchten Elutionsfraktionen deutlich erkennbar (Abbildung 3.3 links, Spuren 3-5). Im Vergleich zeigt die Negativkontrolle eines Lysats von *E. coli* pET15b keine Anreicherung eines Proteins gleicher Größe (Abbildung 3.3 rechts). Alle Fraktionen der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase-Reinigung enthielten weitere Proteine, die eine nicht homogene Reinigung belegen.

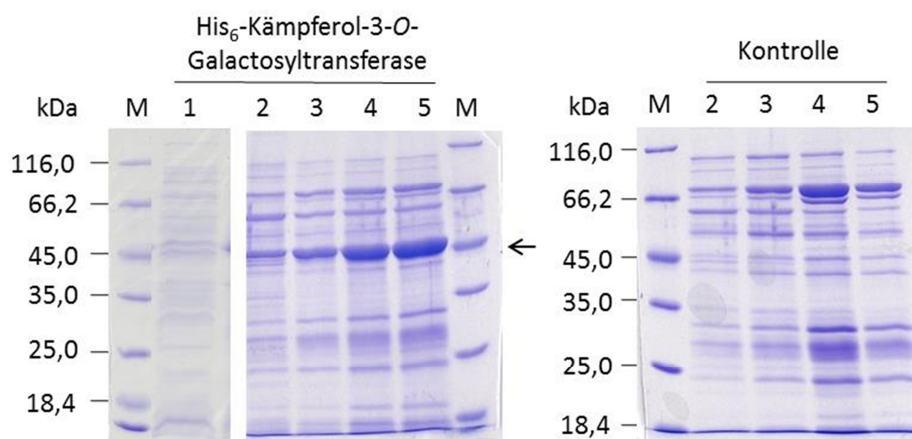
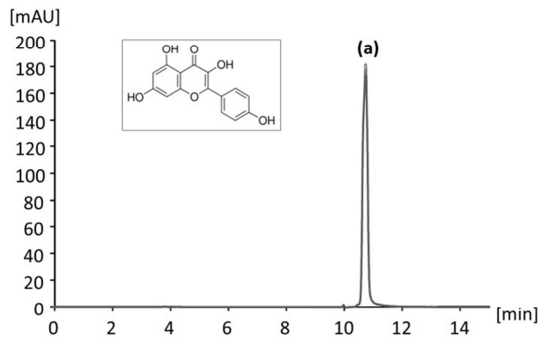


Abbildung 3.3: Elektrophoretische Trennung von Proteinlösungen nach der chromatographischen Aufreinigung zum Nachweis der Expression von His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase.

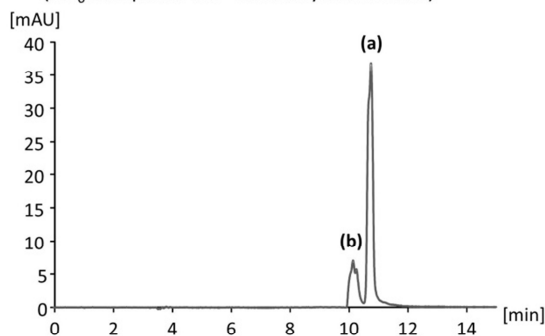
Die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase ($M_w \sim 49,7$ kDa, schwarzer Pfeil) wurde nach Expression in *E. coli* mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Als Kontrolle diente Lysat von *E. coli* pET15b. Aufgetragen wurden je 5 μ l folgender Proteinlösungen: **(1)** Gesamtproteinextrakt vor Chromatographie (1:20 verdünnt); **(2)** Waschfraktion 2; **(3)-(5)** Elutionsfraktionen 1-3; **M**, 5,0 μ l Proteinmarker. Gezeigt ist ein Coomassiegefärbtes SDS-PAGE-Gel (10,5 %).

Für den qualitativen Nachweis enzymatischer Aktivität wurden der Gesamtproteinextrakt und die Elutionsfraktionen mit Kämpferol und UDP-Galactose inkubiert und das Reaktionsprodukt (Kämpferol-Galactosid) mittels HPLC-DAD nachgewiesen. Die Referenzsubstanz Kämpferol hat bei der gemessenen Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum (Abbildung 3.4 A, Peak a). Die Retentionszeit von reinem Kämpferol lag bei 10,7 Minuten. Im Chromatogramm der Enzymreaktionen wurde ein Peak mit R_t 10,2 Minuten (Abbildung 3.4 B und D, Peak b) gefunden. Dieser wurde dem Reaktionsprodukt Kämpferol-Galactosid zugeordnet. Die Inkubation des Gesamtproteinextraktes einer Vektorkontrolle und der hitzedenaturierten Elutionsfraktion mit den Substraten als Negativkontrollen bestätigte, dass die Bildung des Reaktionsproduktes auf die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase zurückzuführen ist (Abbildung 3.4 C und E). Ein Nachweis der Identität des Reaktionsproduktes erfolgte aus zeitlichen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht. Die Ergebnisse zeigten, dass die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase zwar nicht in homogener, aber in aktiver Form aufgereinigt wurde.

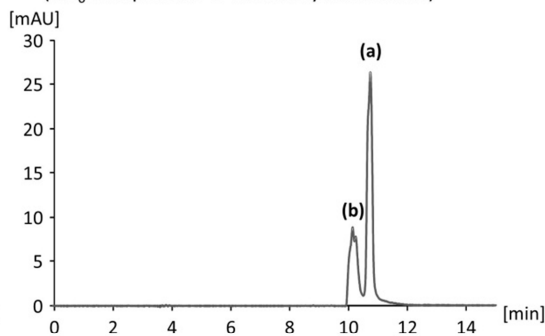
(A) 4,9 nmol Kämpferol



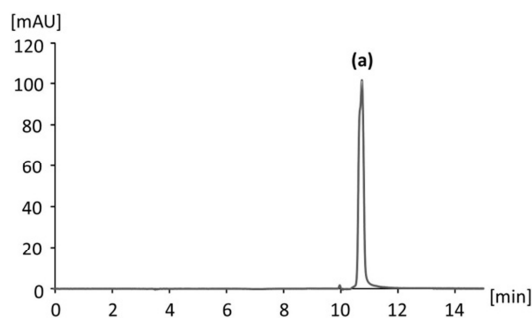
(B) Gesamtproteinextrakt
(His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase)



(D) Elutionsfraktion
(His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase)



(C) Gesamtproteinextrakt (pET15b)



(E) denaturierte Elutionsfraktion
(His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase)

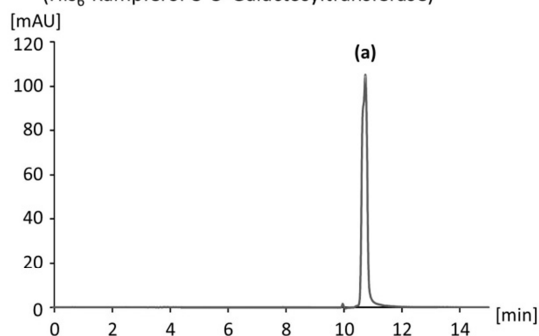


Abbildung 3.4: Qualitative Analyse der Umsetzung von Kämpferol und UDP-Galactose durch die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase.

(A) Die Referenzsubstanz Kämpferol (a) wurde in Methanol mit 1 % (V/V) DMSO gelöst und mit 1,43 µg appliziert. **(B - C)** Proteinlösung (5 µl der Elutionsfraktion bzw. 10 µl des Gesamtproteinextraktes) wurde mit 0,5 mM Kämpferol und 1 mM UDP-Glucose in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % (V/V) Glycerol für 60 Minuten bei 43°C inkubiert. Nach Zusatz von Methanol und Zentrifugation wurde der Überstand mittels HPLC-DAD analysiert. Gezeigt sind HPLC-Chromatogramme für λ = 370 nm. Peak (b) repräsentiert ein Reaktionsprodukt, das jedoch nicht genauer untersucht wurde. **(B)** Gesamtproteinextrakt. **(C)** Negativkontrolle. **(D)** Elutionsfraktion 2. **(E)** Elutionsfraktion 2, hitzedenaturiert.

3.3 Kultivierung, Extraktion und Nachweis im Mikrolitermaßstab

Um zu untersuchen, ob sich der Nachweis der Enzymaktivität der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase auf einen verkleinerten Maßstab in Mikroplatten übertragen lässt, wurden die heterologe Expression, der Zellaufschluss und der Aktivitätstest in Mikroplatten durchgeführt (Kapitel 2.5 und 2.6.2.3). Die Kultivierung erfolgte, wie in Tabelle 3.1 unter # 1 beschrieben, in TB- oder in LB-Medium. Dabei wurde die Expression der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase mit 5 µM oder 20 µM IPTG induziert. Für den Zellaufschluss wurde ein chemisch-enzymatisches Verfahren verwendet (Kapitel 2.5.2). Es wurden drei unterschiedliche Extraktionspuffer (Tabelle 3.2) zur Herstellung der Gesamtproteinextrakte untersucht. Die Expression in TB-Medium mit einer Induktion durch 20 µM IPTG war für beide Glykosyltransferasen geeignet. Der Zellaufschluss mit Extraktionspuffer III war für beide Glykosyltransferasen eine geeignete Variante zur weiteren Verwendung des Gesamtproteinextraktes im Enzymassay.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der getesteten Extraktionspuffer für das Zellaufschlussverfahren in Mikroplatten.

Extraktionspuffer		
III	IV	V
50 mM HEPES pH 7,5	50 mM HEPES pH 7,5	10 mM Tris/HCl pH 7,0
1 mg*ml ⁻¹ DNaseI	30 U Benzonase	30 U Benzonase
10 % (V/V) BugBuster	10 % (V/V) BugBuster	10 % (V/V) BugBuster
1 mg*ml ⁻¹ Lysozym	1 mg*ml ⁻¹ Lysozym	1 mg*ml ⁻¹ Lysozym
1 % (V/V) Triton X-100	1 % (V/V) Triton X-100	
75 mM KCl		20 mM β-Mercaptoethanol
5 mM MgCl ₂		
PMSF		

Für den qualitativen Aktivitätsnachweis beider Glykosyltransferasen in Gesamtproteinextrakten wurden die Bedingungen der jeweiligen Assays ebenfalls in Mikroplatten (Kapitel 2.6.2.3) getestet. Da das Ziel war, ein System für ein Hochdurchsatz-Screening zu entwickeln - also unabhängig von einer Aufreinigung - wurden hier nur die Gesamtproteinextrakte untersucht. Als Negativkontrolle wurde hitzedenaturierter Gesamtproteinextrakt mitgeführt. Der Nachweis entstehender Produkte wurde mittels HPLC-DAD durchgeführt. Für die Identifizierung der Peaks standen die Referenzsubstanzen p-Arbutin, Hydrochinon (Abbildung 3.5 A, Peak a und b) und Kämpferol (Abbildung 3.6 A, Peak a) zur Verfügung.

Nach der Inkubation der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase mit Hydrochinon und UDP-Glucose wurde das Reaktionsprodukt p-Arbutin nachgewiesen (Abbildung 3.5 B, Peak a). In der Negativkontrolle (hitzenedenaturierter Gesamtproteinextrakt) wurde, wie erwartet, nur Hydrochinon detektiert (Abbildung 3.5 C, Peak b). Dies zeigte, dass der Enzymassay im Mikrolitermaßstab durchgeführt werden kann.

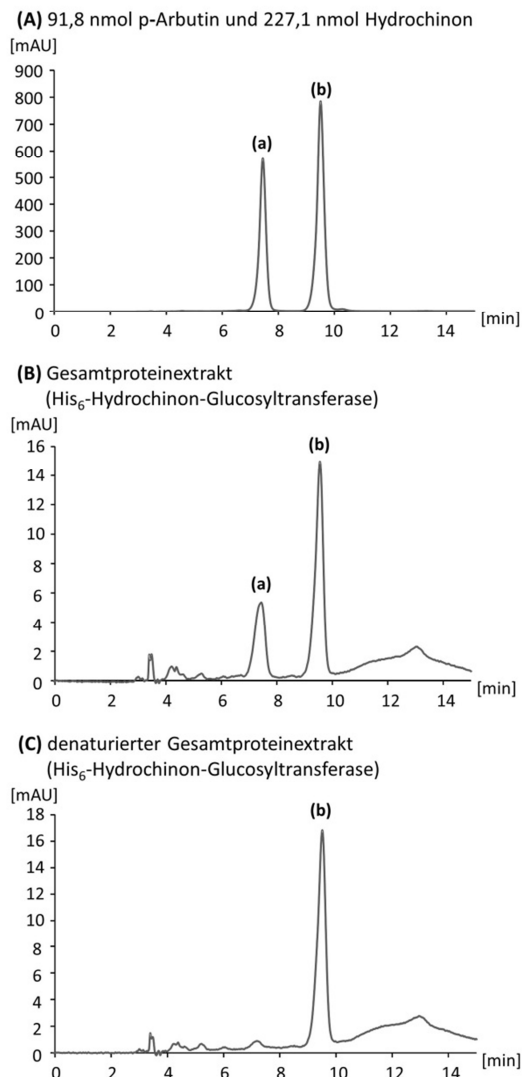


Abbildung 3.5: Qualitativer Nachweis des Reaktionsproduktes der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase-Gesamtproteinextrakte im Mikrolitermaßstab.

(A) Die Referenzsubstanzen p-Arbutin (a) und Hydrochinon (b) wurden in Methanol mit 2 mM Tris/HCl in H₂O, pH 7,5 gelöst und mit je 25 µg appliziert. (B - C) Proteinlösung (10 µg Gesamtprotein) wurde mit 2 mM Hydrochinon und 2 mM UDP-Glucose in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % Glycerol bei 43°C für 60 Minuten inkubiert. Nach Zusatz von Methanol und Zentrifugation wurde der Überstand mittels HPLC-DAD analysiert. Gezeigt sind HPLC-Chromatogramme für λ = 285 nm. (B) Gesamtproteinextrakt. (C) Negativkontrolle.

Nach der Inkubation der His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase mit Kämpferol und UDP-Galactose wurde das Reaktionsprodukt Kämpferol-Galactosid nachgewiesen (Abbildung 3.6 B, Peak b). Das Signal des gebildeten Produktes war im Vergleich zum detektierten Kämpferol sehr gering. In der Negativkontrolle (hitzenedenaturierter Gesamtproteinextrakt) wurde, wie erwartet, nur Kämpferol detektiert (Abbildung 3.6 C, Peak a). Für eine bessere chromatographische Trennung wurde der Assay mit einer geringeren Konzentration Kämpferol durchgeführt (Abbildung 3.7). Die Ergebnisse zeigten, dass der Enzymassay im Mikrolitermaßstab auch für die His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase durchgeführt werden kann.

Bei geringerer Enzymaktivität könnte die Empfindlichkeit der HPLC-DAD-Methode jedoch zu gering für einen Produktnachweis sein.

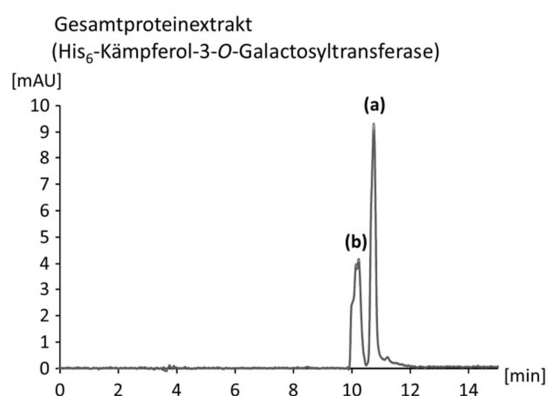
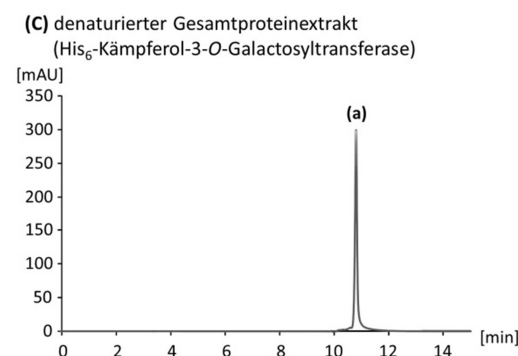
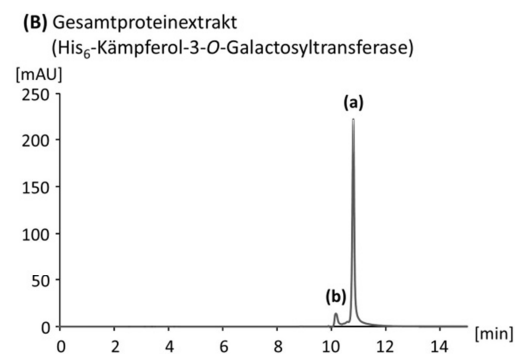
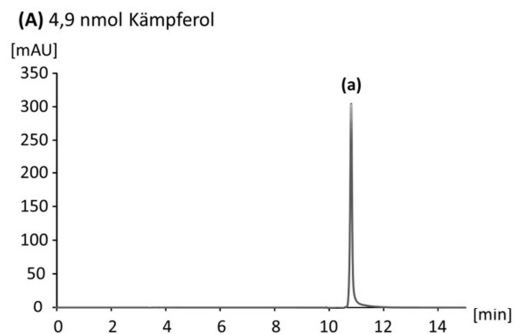


Abbildung 3.6: Qualitativer Nachweis des Reaktionsproduktes der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase-Gesamtproteinextrakte im Mikrolitermaßstab.

(A) Die Referenzsubstanzen Kämpferol (a) wurde in Methanol mit 1 % (V/V) DMSO gelöst und mit je 1,43 µg appliziert. **(B - C)** Proteinlösung (10 µl Gesamtprotein) wurde mit 2 mM Kämpferol und 2 mM UDP-Galactose in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % Glycerol bei 43°C für 60 Minuten inkubiert. Nach Zusatz von Methanol und Zentrifugation wurde der Überstand mittels HPLC-DAD analysiert. Gezeigt sind HPLC-Chromatogramme für λ= 370 nm. Peak (b) repräsentiert ein Reaktionsprodukt, das jedoch nicht genauer untersucht wurde. **(B)** Gesamtproteinextrakt. **(C)** Negativkontrolle.

Abbildung 3.7: Qualitativer Nachweis des Reaktionsproduktes des His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase-Gesamtproteinextraktes mit veringterter Kämpferol-Konzentration.

Proteinlösung (10 µl Gesamtprotein) wurde mit 0,5 mM Kämpferol (a) und 2 mM UDP-Galactose in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % Glycerol bei 43°C für 60 Minuten inkubiert. Nach Zusatz von Methanol und Zentrifugation wurde der Überstand mittels HPLC-DAD analysiert. Gezeigt sind HPLC-Chromatogramme für λ= 370 nm. Peak (b) repräsentiert ein Reaktionsprodukt, das jedoch nicht genauer untersucht wurde.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass identische Bedingungen für die heterologe Expression beider Glykosyltransferasen und für den Zellaufschluss verwendet werden können. Auch der Aktivitätsnachweis beider Enzyme kann unter identischen Bedingungen in Bezug auf die Inkubationszeit und -temperatur und den verwendeten Puffer durchgeführt werden. Das Verfahren zur Produktion von Gesamtproteinextrakten und zur Durchführung der Aktivitätstests im Mikrolitermaßstab wurde im Anschluss auf die chimären Glykosyltransferasen übertragen (Kapitel 3.6).

3.4 Validierung der Nachweismethoden für Glykosyltransferasen

3.4.1 Klonscreening mit *E. coli*-Kolonien durch Nachweis einer pH-Änderung

Bei Aktivität von Glykosyltransferasen kommt es durch die Protonenfreisetzung zu einer Senkung des pH-Wertes. Die pH-Änderung kann durch pH-Indikatoren detektiert und als universelle Nachweismethode für die Aktivität von Glykosyltransferasen genutzt werden [115, 116]. Eine Methode des Klonscreenings durch Nachweis der pH-Änderung wurde mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase erprobt. Hierzu wurden Bakterienkolonien auf einem mit den Substraten getränkten Filterpapier mit Hilfe der Indikatoren Kresolrot oder Bromthymolblau untersucht (Kapitel 2.6.1.2.1). Der Farbumschlagpunkt von Kresolrot liegt zwischen pH 8,8 und 7,0 und zeigt eine Farbänderung von Violettrötlich im basischen Milieu zu Gelb im sauren Milieu (Abbildung 3.8).

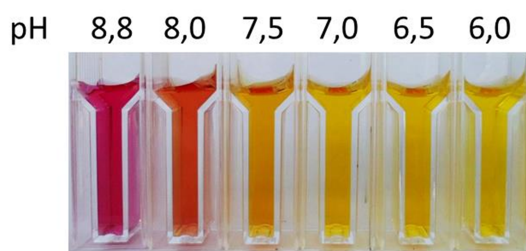


Abbildung 3.8: Farbänderung von Kresolrot.

2 mM Tris/HCl mit 0,05 mM Kresolrot wurde mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt.

Es wurden zwei verschiedene Expressionsstämme mit dem Konstrukt pQE-2_AS getestet. Nach der Inkubation der Filterpapiere bei 37°C zeigte sich um die Bakterien (transformiert mit pQE-2_AS oder pET15b als Negativkontrolle) ein orange-farbener Hof. Eine unterschiedliche Färbung der Bakterien zeigte sich erst nach einer weiteren Inkubation für 19 Stunden bei Raumtemperatur (Abbildung 3.9). Eine orange Färbung trat erwartungsgemäß nur bei *E. coli* mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase auf. Im Vergleich dazu wies die Negativkontrolle eine rote Färbung auf. Der Farbunterschied war jedoch visuell schwer auszumachen, und die unterschiedliche Färbung konnte in weiteren Assays nicht zuverlässig reproduziert werden.

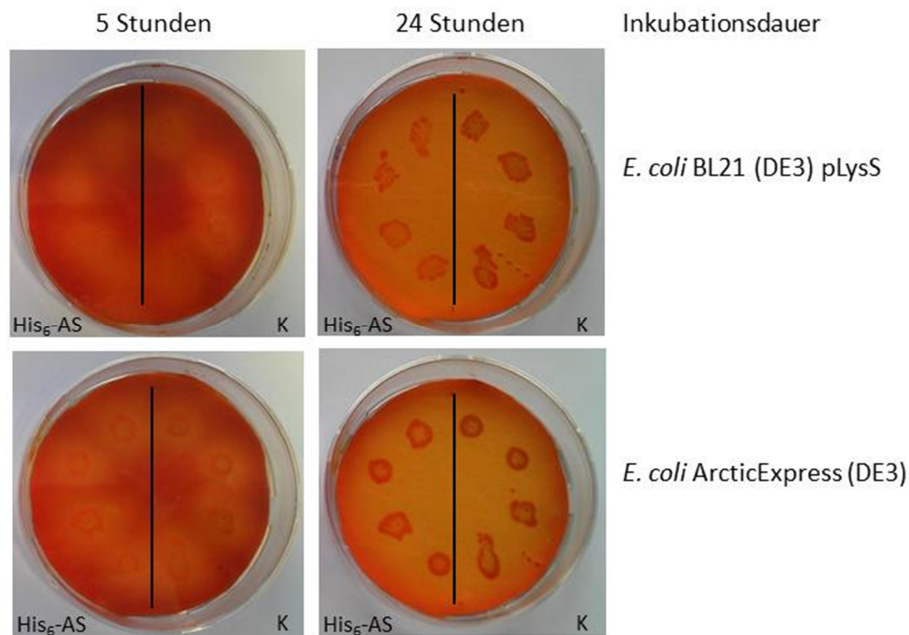


Abbildung 3.9: Kolonie-Screening auf Hydrochinon-Glucosyltransferase-Aktivität durch Nachweis freigesetzter Protonen mit Kresolrot unter Verwendung von pQE-2_AS.

Die *E. coli*-Stämme (BL21 (DE3) pLysS und ArcticExpress (DE3)) wurden mit pQE-2_AS oder pET15b transformiert. Die Kolonien wurden auf Filterpapiere übertragen. Nach 5 Stunden bei 37°C wurden die Filterpapiere weitere 19 Stunden bei RT inkubiert. Die Inkubation der Filterpapiere erfolgte nach Eintauchen in 2 ml Substratlösung I (50 mM Kresolrot, 2 mM Hydrochinon, 10 mM UDP-Glucose, pH 7,4). Filterpapiere von *E. coli* mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (His₆-AS) und der Negativkontrolle pET15b (K).

Für eine bessere Vergleichbarkeit mit der Negativkontrolle pET15b wurde die cDNA der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase in den Vektor pET15b umklontiert (Kapitel 2.2.8 und 2.2.9), da pQE-2 nicht als Leervektor zur Verfügung stand. Das Kolonie-Screening mit *E. coli*, die mit pET15b_AS_{fulllength} oder pET15b transformiert waren, zeigte keinen farblichen Unterschied (Abbildung 3.10).

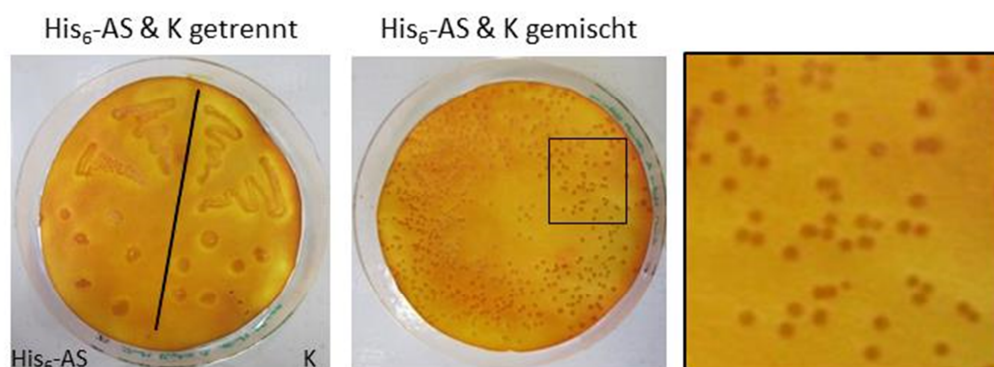


Abbildung 3.10: Kolonie-Screening auf Hydrochinon-Glucosyltransferase-Aktivität durch Nachweis freigesetzter Protonen mit Kresolrot unter Verwendung von pET15b_AS.

Der *E. coli*-Stamm ArcticExpress (DE3) wurde mit pET15b_AS_{fulllength} oder pET15b transformiert. Die Kolonien wurden auf Filterpapiere übertragen. Die Inkubation der Filterpapiere erfolgte für 5 Stunden bei 37°C nach Eintauchen in 2 ml Substratlösung I (50 mM Kresolrot, 2 mM Hydrochinon, 10 mM UDP-Glucose, pH 7,4). Filterpapiere von *E. coli* mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (His₆-AS) und der Negativkontrolle pET15b (K). Vergrößerter Ausschnitt zur Betrachtung von Einzelkolonien (rechts).

Eine Änderung der Konzentration von IPTG in der Agarplatte von 0,01 mM bis 0,25 mM hatte keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Ebenso führten auch Veränderungen an der Substratlösung oder bestimmten Testbedingungen (Tabelle 3.3) nicht dazu, dass Kolonien mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase von Kolonien, die nur den Leervektor trugen, unterscheidbar waren.

Tabelle 3.3: Variationen der Substratlösung und der Nachweisreaktion zur Detektion aktiver Glykosyltransferasen mit Kresolrot auf Filterpapier.

Substratlösung			Nachweisreaktion	
pH-Wert	7,5		Inkubationsdauer	5 - 24 h
Kresolrot-Indikatorlösung I	2,6 - 50,0 mM	Kresolrot	Substratlösung	1,5 - 2,0 ml
Kresolrot-Indikatorlösung II				
Zuckerakzeptor	1,0 - 3,6 mM	Hydrochinon	Temperatur	37°C
	2,0 mM	Vanillin		
Zuckerdonor	2 - 10 mM	UDP-Glucose	Petrischale	offen oder geschlossen

Der Indikator Bromthymolblau wurde ausschließlich mit *E. coli* ArcticExpress (DE3) verwendet. Der Farbumschlagpunkt des Indikators liegt zwischen pH 7,6 und 5,8 und zeigt eine Farbänderung von Blau im basischen Milieu zu Grüngelb im sauren Milieu (Abbildung 3.11).

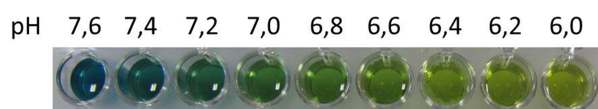


Abbildung 3.11: Farbänderung von Bromthymolblau.

10 mM Tris/HCl mit 0,11 mM Bromthymolblau wurde mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt.

Kolonien von *E. coli*, die pET15b_AS oder pET15b enthielten, wurden auf Filterpapiere übertragen, die mit Substratlösung II behandelt wurden. Nach der Inkubation bei 37°C erschienen *E. coli* mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase wie erwartet hellgrün (Abbildung 3.12 A). Die Negativkontrolle mit pET15b zeigte im Vergleich eine dunkelgrüne Färbung. Im Screening eines Gemisches von *E. coli* mit pET15b_AS und der Negativkontrolle waren hellgrüne und dunkelgrüne Kolonien sichtbar. Zudem wurde um die dunkelgrünen Bakterien ein Hof beobachtet (Abbildung 3.12 B).

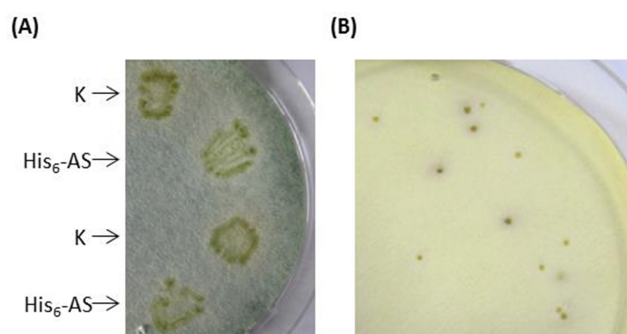


Abbildung 3.12: Kolonie-Screening auf Hydrochinon-Glucosyltransferase-Aktivität durch Nachweis freigesetzter Protonen unter Verwendung von Bromthymolblau und pET15b_AS.

Der *E. coli*-Stamm ArcticExpress (DE3) wurde mit pET15b_AS_{fulllength} oder pET15b transformiert. Die Kolonien wurden auf Filterpapiere übertragen. Die Inkubation der Filter erfolgte bei 37°C für 6 Stunden nach Eintauchen in 1,5 ml Substratlösung II (0,8 mM Bromthymolblau, 2 mM Hydrochinon, 10 mM UDP-Glucose, pH 7,4). **(A)** Filterpapiere von *E. coli* pET15b_AS_{fulllength} (His₆-AS) und der Negativkontrolle pET15b (K). **(B)** Gemisch aus *E. coli* pET15b_AS_{fulllength} und pET15b.

Zur Überprüfung der Zuordnung von His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase produzierenden Kolonien und Negativkontrollen anhand ihrer Färbung durch Bromthymolblau wurde die Plasmid-DNA untersucht. Hierzu wurden drei hellgrüne und drei dunkelgrüne Kolonien vom Filterpapier (Abbildung 3.12 B) in Flüssigmedium kultiviert und für die Plasmidisolierung verwendet. Nach dem Verdau mit *Bam*HI und *Nde*I wurde die DNA elektrophoretisch getrennt (Abbildung 3.13). Zwei der drei hellgrünen und als positiv getesteten Kolonien zeigten die für pET15b_AS_{fulllength} erwartete Bande mit einer Größe von 1.413 bp. Alle dunkelgrünen Kolonien enthielten nur die DNA des Vektors pET15b.

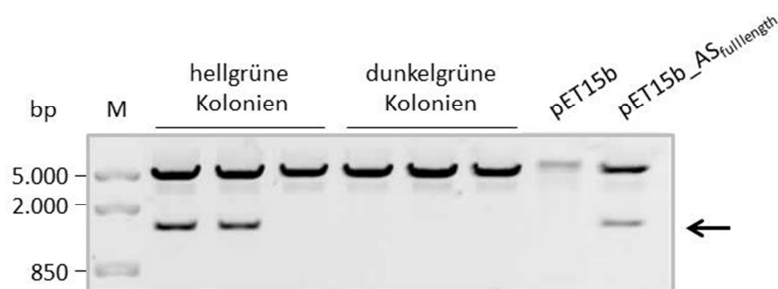


Abbildung 3.13: Restriktionsanalyse einzelner Kolonien nach dem Klonscreening mit Bromthymolblau.

Trennung der Plasmid-DNA hellgrüner und dunkelgrüner Kolonien nach *Bam*HI/*Nde*I-Verdau (0,8 %-iges Agarosegel). Zur Kontrolle wurde DNA der Vektoren pET15b und pET15b_AS_{fulllength} verdaut. Pfeil, Fragment aus pET15b_AS_{fulllength} (1.413 bp). **M**, 0,1 µg DNA-Größenstandard.

Aus diesem Ergebnis folgt, dass eine eindeutige Unterscheidung der Bakterien mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase von Bakterien ohne His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase auf Filterpapier mit Bromthymolblau visuell nicht mit hundertprozentiger Sicherheit möglich ist. Die Veränderungen der Substratlösung, bestimmter Testbedingungen (Tabelle 3.4) oder der Einsatz verschiedener Filterpapiere und Membranen (Tabelle 3.5) verbesserte die Zuordnung nicht.

Tabelle 3.4: Variation der Substratlösung und der Nachweisreaktion zur Detektion aktiver Glykosyltransferasen mit Bromthymolblau.

Substratlösung			Nachweisreaktion	
pH-Wert	7,0 - 7,4		Inkubationsdauer	5 - 24 h
Bromthymolblau-Indikatorlösung	0,8 mM	Bromthymolblau	Substratlösung	1,5 ml
Zuckerakzeptor	2 - 10 mM	Hydrochinon	Temperatur	37°C
Zuckerdonor	5 - 10 mM	UDP-Glucose	Petrischale	offen oder

Tabelle 3.5: Verwendete Filterpapiere zum Klonscreening mit Bromthymolblau.

Filterpapiere	Typ	Porengröße [µm]	Hersteller
Filtrierpapier	MN615 (No. 1)	4 - 12	Macherey-Nagel GmbH und Co. KG (Düren)
Nitrocellulose	Protran BA85	0,45	Whatman (OMNILAB Laborzentrum GmbH und Co. KG, Bremen)
PVDF¹-Transfermembran	WESTRAN-S	0,20	Whatman (OMNILAB Laborzentrum GmbH und Co. KG, Bremen)

¹ PVDF, Polyvinylidenfluorid

Es wurden daher zwei weitere Varianten der Durchführung mit pET15b_AS_{fulllength}- bzw. pET15b-transformierten *E. coli* ArcticExpress (DE3) getestet. Bei der Variante I wurde das Filterpapier mit transferierten Kolonien auf festes M9-Minimalmedium aufgelegt und mit 1,5 ml Substratlösung II überschichtet. Das M9-Minimalmedium enthielt zusätzlich 0,01 mM Bromthymolblau und 0,02 mM IPTG. Die Inkubation der Agarplatte mit aufgelegtem Filter erfolgte bei 37°C für mehrere Stunden. Bei der Variante II wurde auf Filterpapier verzichtet. Es wurden 5 µl Transformationsansatz direkt auf LB- oder M9-Medium ausgestrichen, das neben 0,05 mM Kresolrot oder 0,01 mM Bromthymolblau 3,6 mM Hydrochinon und 8 mM UDP-Glucose sowie 0,02 mM IPTG enthielt. Die Inkubation der Agarplatte erfolgte bei 37°C für etwa 16 Stunden. Die Auswertung erfolgte visuell und in regelmäßigen Abständen während der Inkubation. Beide Varianten führten nicht dazu, dass Ansätze mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase von der Negativkontrolle unterscheidbar waren.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass ein Kloniescreening durch Detektion der pH-Änderung prinzipiell mittels Indikator möglich ist. Jedoch erschien diese Nachweismethode wenig zuverlässig.

3.4.2 Klonscreening in Flüssigkulturen durch Nachweis einer pH-Änderung

Als eine weitere Möglichkeit für den Nachweis von Glykosyltransferasen wurden *E. coli*-Kulturen in LB-Flüssigmedium mit Bromthymolblau untersucht. Die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (pET15b_AS_{fulllength}) wurde als Modell verwendet. Als Negativkontrolle wurden *E. coli* mit dem Leervektor pET15b genutzt. Die Flüssigkulturen für die Nachweisreaktion wurden mit oder ohne Durchmischung inkubiert. Beispielhaft sind die Ergebnisse einer in Standkultur durchgeführten Untersuchung gezeigt (Abbildung 3.14). Beide Kulturansätze wiesen zu Beginn die erwartete blaue Färbung auf. Im Verlauf der Inkubation zeigte die

Probe mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase-Expression die erwartete Farbänderung zu Gelbgrün. Diese Änderung wurde jedoch auch für die Negativkontrolle pET15b beobachtet.

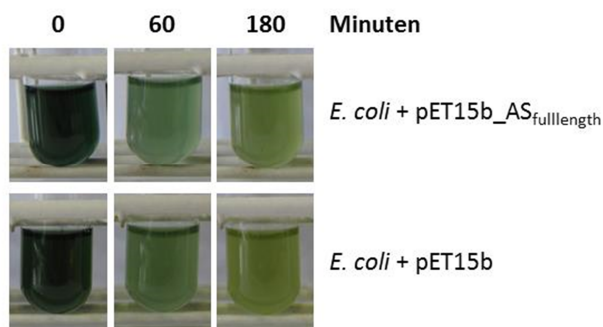


Abbildung 3.14: Farbumschlag in *E. coli*-Kulturen mit Bromthymolblau.

Das LB-Flüssigmedium (2 ml) enthielt 2 mM Hydrochinon, 10 mM UDP-Glucose und 0,04 mM Bromthymolblau bei pH 7,4 und wurde mit 250 µl *E. coli*-Kultur inokuliert und bei 37°C stehend für bis zu drei Stunden inkubiert.

Es zeigte sich, dass auch mit einer konstanten Durchmischung oder Änderungen bestimmter Testbedingungen (Tabelle 3.6) der Ansatz der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase nicht von der Kontrolle unterscheidbar war. Daher wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Tabelle 3.6: Variierte Testbedingungen zum Nachweis einer pH-Änderung mit Bromthymolblau in Flüssigkultur.

Inokulum	250 µl oder 500 µl Vorkultur
Konzentration Bromthymolblau	0,04 mM oder 0,1 mM
Substratkonzentration	<ul style="list-style-type: none"> • ohne Substrate • 2 mM Hydrochinon + 10 mM UDP-Glucose • 10 mM Hydrochinon + 10 mM UDP-Glucose
Mischen	0 UpM oder 230 UpM
Inkubationsdauer	0 bis 6,5 Stunden

3.4.3 Nachweis der Protonenfreisetzung als Enzymassay im Mikrolitermaßstab

Die Freisetzung von Protonen während der Glykosylierungsreaktion wurde mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und dem Indikator Bromthymolblau untersucht. Vorab wurden Vorversuche mit Kresolrot durchgeführt. Kresolrot hat zwei Absorptionsmaxima (430 nm, 573 nm). Die hypsochrome Verschiebung von Rot (pH 8,0) zu Gelb (pH 6,0) führt zu einem hyperchromen Effekt bei 430 nm (Absorption blauen Lichtes) und einem hypochromen Effekt bei 573 nm (grün-gelbes Licht) (Abbildung 3.15).

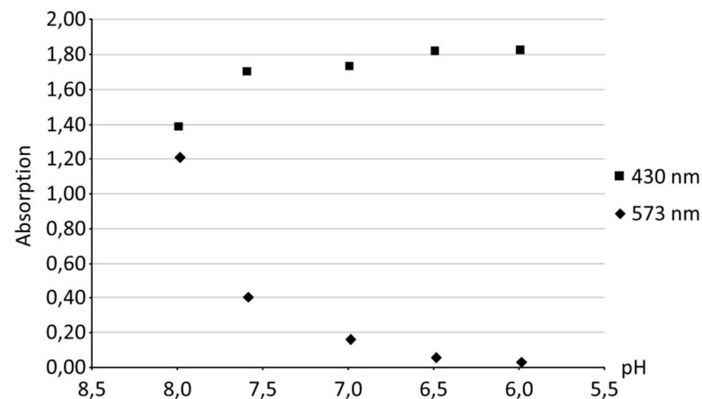


Abbildung 3.15: pH-Abhängigkeit der Absorption von Kresolrot.

2 mM Tris/HCl mit Kresolrot-Indikatorlösung (Endkonzentration 0,05 mM) wurde mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt. Die Absorption wurde im UV-VIS-Spektrophotometer bei 430 nm und 573 nm gemessen.

Insgesamt deuteten die Ergebnisse der Vorversuche mit Kresolrot darauf hin, dass der photometrische Nachweis der pH-Änderung in Enzymreaktionen prinzipiell nutzbar sein könnte. Für die Anwendung im Hochdurchsatz-Screening mit Protein- und Gesamtproteinextrakten der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase erschien Kresolrot jedoch nicht geeignet.

Die Verwendung von Bromthymolblau für einen Nachweis von Glykosyltransferasen in Mikroplatten im Hochdurchsatz wurde bereits beschrieben [116]. Der Indikator Bromthymolblau besitzt zwei Absorptionsmaxima (433 nm, 618 nm). Die hypsochrome Verschiebung von Blau (pH 7,6) zu Grün (pH 6,0) führt zu einem hyperchromen Effekt bei 433 nm und zu einem hypochromen Effekt bei 618 nm. Es sollte eine Methode ausschließlich für den qualitativen Nachweis der Enzymaktivität im Gesamtproteinextrakt etabliert werden. Der Erwerb eines Filters für 430 nm ermöglichte Messungen in Mikroplatten bei 430 nm. Bromthymolblau (0,11 mM) zeigte bei sinkenden pH-Werten die erwartete Zunahme der Absorption bei 430 nm (Abbildung 3.16). Eine Indikatorkonzentration von 0,01 mM führte nicht zu einer ausreichenden Absorptionsänderung (Abbildung 3.16) für den qualitativen Aktivitätsnachweis. Die Verringerung der Pufferkonzentration auf 2 mM für nachfolgende Versuche beeinflusste den Verlauf der Absorptionsänderung nicht.

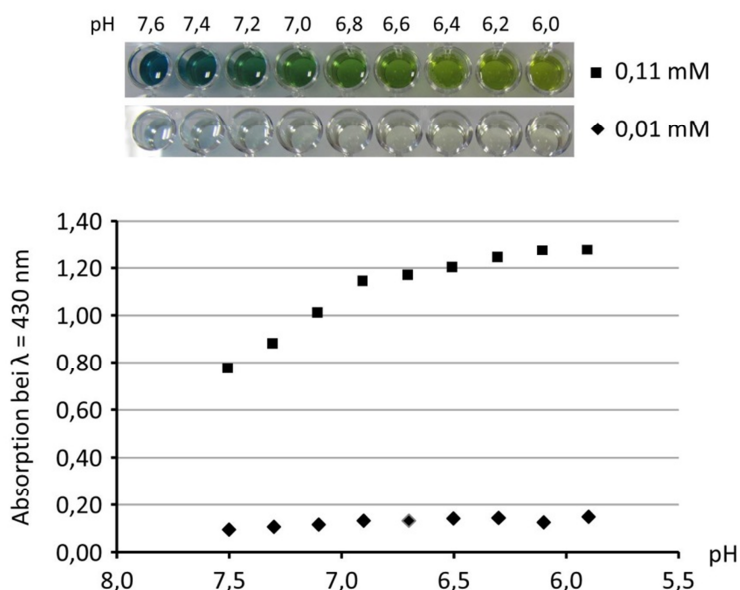


Abbildung 3.16: Farb- und Absorptionsänderung von Bromthymolblau bei pH-Änderung.

10 mM Tris/HCl mit 0,11 mM (■) oder 0,01 mM (◆) Bromthymolblau wurde mit HCl auf verschiedene pH-Werte eingestellt. Die Absorption wurde bei 430 nm im Mikroplatten-Photometer gemessen.

Zur Testung der Nachweismethode mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase wurde Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit pET15b_AS entweder mit dem Zellaufschluss A (Kapitel 2.4.2) oder mit dem chemisch-enzymatischen Zellaufschluss in Mikroplatten (Kapitel 2.5.2) hergestellt. Die Aktivität der Glucosyltransferase im Gesamtproteinextrakt wurde durch einen Enzymassay mit Produktnachweis mittels HPLC-DAD bestätigt. Die Absorption des Reaktionsansatzes mit Bromthymolblau wurde über dem Reaktionsverlauf in Mikroplatten gemessen. Als Negativkontrollen wurden Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit pET15b (Vektorkontrolle) und hitzedenaturierter Gesamtproteinextrakt mitgeführt.

Die Enzymreaktion mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (Zellaufschluss A) in Mikroplatten (Kapitel 2.4.2) zeigte nach 120 Minuten Inkubation den erwarteten Farbumschlag von Blau zu Gelb (Abbildung 3.17 A). Die Negativkontrollen wiesen eine blaue Färbung auf. Der Farbumschlag ließ sich in vier unabhängigen Messungen durch die Messung der Absorption bei 430 nm verfolgen. Alle Messungen führten zu einem ähnlichen, wie in Abbildung 3.17 B gezeigten Ergebnis. Die Absorption bei 430 nm nahm in der Probe mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase zu. In der Probe mit hitzedenaturiertem Protein kam es zu einer leichten Abnahme (Abbildung 3.17 B). Diese Kontrolle zeigte, dass die Absorptionsänderung auf enzymatische Aktivität zurückzuführen war. Die Vektorkontrolle zeigte unerwartet einen Anstieg der Absorptionswerte, der jedoch unterhalb des Anstieges der Ansätze mit Glykosyltransferase lag (Abbildung 3.17 B).

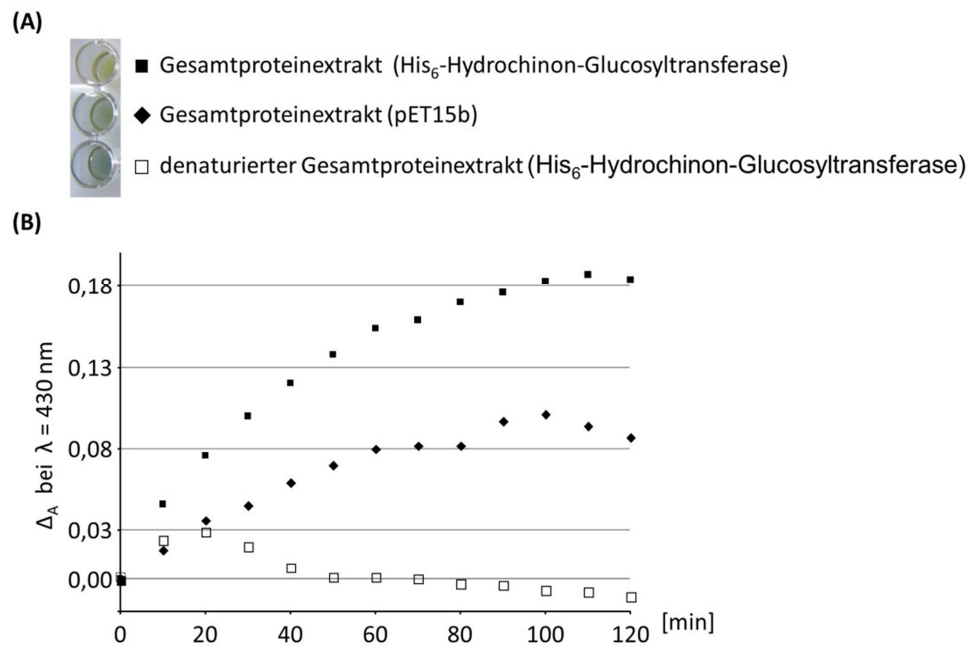


Abbildung 3.17: Aktivitätsnachweis von His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase in Mikroplatten (Kapitel 2.4.2) mit Bromthymolblau nach Zellaufschluss A.

(A) Farbgebung der Reaktionsansätze nach einer Inkubation von 120 Minuten. (B) Untersuchung der Absorptionsänderung bei 430 nm. Die Reaktionslösung enthielt 2 μl Gesamteinproteinextrakt, 0,11 mM Bromthymolblau, 2 mM Tris/HCl pH 7,0 und 2 mM Hydrochinon. Mit der Zugabe von 2 mM UDP-Glucose wurde die Reaktion gestartet und bei 37°C für 120 Minuten inkubiert. Als Negativkontrollen wurde Gesamteinproteinextrakt von *E. coli* mit pET15b und hitzedenaturierter Gesamteinproteinextrakt verwendet. Die Gesamteinproteinextrakte wurden mit dem Zellaufschluss A hergestellt (Kapitel 2.4.2). Der Versuch führte mit unabhängigen Gesamteinproteinextrakten viermal zu dem gezeigten Ergebnis.

Um die Methode für das Hochdurchsatz-Screening zu optimieren, wurde im Folgenden auch der Zellaufschluss im Mikrolitermaßstab durchgeführt. Die Enzymreaktion mit dem erhaltenen Gesamteinproteinextrakt mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (2 μl Gesamteinproteinextrakt) zeigte nach 60 Minuten Inkubation den erwarteten Farbumschlag von Blau zu Gelb (Abbildung 3.18 A). Die Vektorkontrolle zeigte jedoch ebenfalls auch den Farbumschlag von Blau zu Gelb. Der Farbumschlag ließ sich durch Messung der Absorption bei 430 nm verfolgen. Die Absorption bei 430 nm nahm in der Probe mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase zu. Die Vektorkontrolle zeigte unerwartet einen Anstieg der Absorptionswerte, der jedoch unterhalb des Anstieges der Ansätze mit Glykosyltransferase lag. Der Versuch führte mit unabhängig erzeugten Gesamteinproteinextrakten fünfmal zu dem gezeigten Ergebnis (Abbildung 3.18 A). Bei Verwendung von 8 μl Gesamteinproteinextrakt mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase war der Reaktionsansatz bereits zu Reaktionsbeginn gelb gefärbt. Die Vektorkontrolle zeigte während der Inkubationszeit nur eine blaue Farbe (Abbildung 3.18 B). Damit konnte visuell zwischen aktiven und inaktiven Gesamteinproteinextrakten unterschieden werden. Die Absorption (430 nm) der Ansätze mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltrans-

ferase stieg im Reaktionsverlauf (10 - 60 Minuten) und lag wie erwartet höher als die der Vektorkontrolle. Die Absorption (430 nm) der Vektorkontrolle sank im Reaktionsverlauf. Der Versuch führte mit unabhängig erzeugten Gesamtproteinextrakten zweimal zu dem gezeigten Ergebnis (Abbildung 3.18 B). Der visuelle oder photometrische Nachweis der pH-Änderung in einer Enzymreaktion ist also prinzipiell mit Bromthymolblau möglich. Auch wenn Zellaufschluss A (Kapitel 2.4.2) die besseren Ergebnisse lieferte, ist für den Zellaufschluss im Hochdurchsatz nur der Zellaufschluss für Mikroplatten (Kapitel 2.5.2) geeignet. Für den Aktivitätsnachweis müssen mindestens 8 µl Gesamtproteinextrakt eingesetzt werden (Abbildung 3.18). Da der Nachweis im Mikrolitermaßstab geführt werden konnte, wurde die Methode in einem Hochdurchsatz-Screening für den Nachweis chimärer Glykosyltransferasen eingesetzt (Kapitel 3.6).

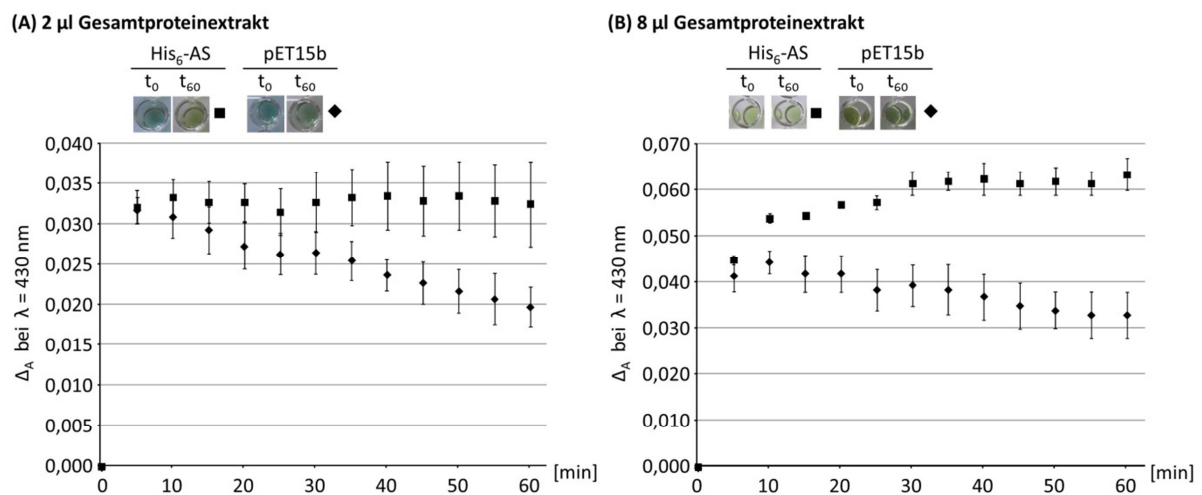


Abbildung 3.18: Aktivitätsnachweis von His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase in Mikroplatten mit Bromthymolblau nach Zellaufschluss in Mikroplatten.

Farbgebung zu Beginn (t₀) oder nach Abschluss (t₆₀) der Inkubation und Untersuchung der Absorptionsänderung bei 430 nm. Die Reaktionslösung enthielt **(A)** 2 µl oder **(B)** 8 µl Gesamtproteinextrakt, 0,11 mM Bromthymolblau, 2 mM Tris/HCl pH 7,0 und 2 mM Hydrochinon. Mit Zugabe von 2 mM UDP-Glucose wurde die Reaktion gestartet und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Gesamtproteinextrakt von *E. coli* mit pET15b verwendet. His₆-AS = His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase. Die Gesamtproteinextrakte wurden im Zellaufschluss für Mikroplatten hergestellt (Kapitel 2.5.2). Gezeigt ist der Mittelwert ± SD der Absorptionsänderung aus n unabhängigen Versuchen (A, n = 5 und B, n = 2).

3.4.4 Nachweis der Glykosylierung mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die Ermittlung geeigneter Massenübergänge für die Bestimmung von Hydrochinonglykosiden erfolgte zunächst durch die Analyse von p-Arbutin als Standardsubstanz. Die Masse $[M-H]^- = 271$ entspricht, gemessen im ESI-Negativ-Modus, der Molekülmasse des p-Arbutins. Das Mutterion ($[M-H]^- = 271$) wurde in Fragmentionen mit m/z 161, m/z 108 und m/z 101 zerlegt (Abbildung 3.19 A). Im Spektrum ist das Mutterion bei der gewählten Kollisionsenergie nicht sichtbar. Die entstandenen Fragmentionen von p-Arbutin wurden von Dr. H.-M. Schiebel (Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig) mit möglichen Summenformeln beschrieben (Abbildung 3.19 B).

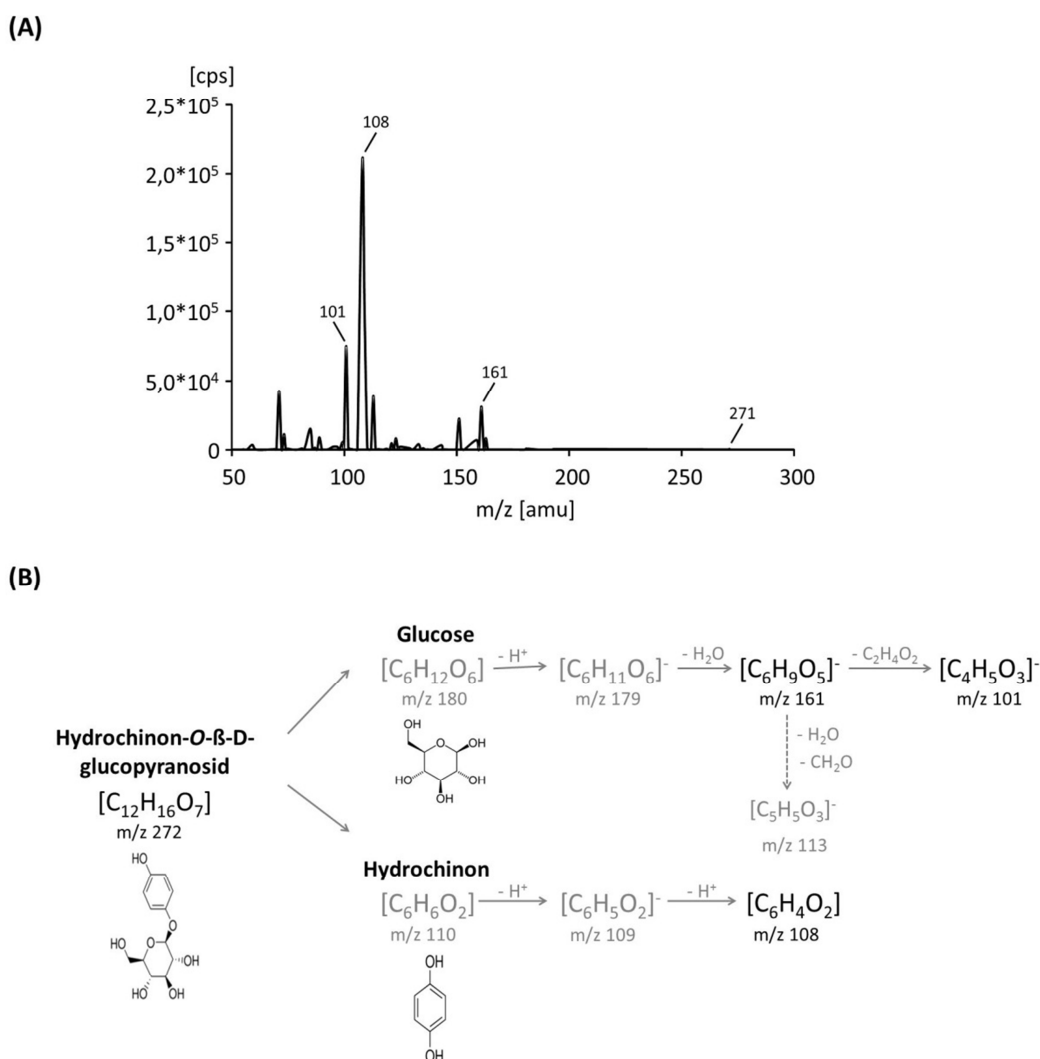


Abbildung 3.19: ESI-Fragmentierung von p-Arbutin.

Für den Nachweis von p-Arbutin wurden die Massenübergänge m/z 271/101, m/z 271/108 und m/z 271/161 ermittelt (A). Die Zuordnung der Fragmentionen (B) erfolgte durch Dr. H.-M. Schiebel vom Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig. Die angenommenen Summenformeln der nachgewiesenen Fragmentionen sind in schwarz dargestellt. Die Summenformeln weiterer möglicher Fragmentionen sind in grau dargestellt.

Die MRM-Methode wurde für die Übergänge m/z 271/101, m/z 271/108 und m/z 271/161 optimiert. Die Fragmentionen traten bei der Analyse unabhängig von einer vor-

herigen chromatographischen Trennung mit den in Tabelle 3.7 beschriebenen Intensitätenverhältnissen auf (Abbildung 3.20 A und B). Die Empfindlichkeit wurde durch die Analyse von 10 nM - 500 nM p-Arbutin-Lösungen untersucht. Dabei war die minimal eingesetzte Stoffmenge der Reinsubstanz p-Arbutin von 0,1 pmol ohne chromatographische Trennung (Arbutin_3MRM) oder 0,5 pmol mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) mit der HPLC-ESI-MS/MS noch nachweisbar. Das Verfahren ohne chromatographische Trennung wurde zur Untersuchung der Enzymaktivität von Gesamtextrakten aus *E. coli* mit chimären Glykosyltransferase-Konstrukten eingesetzt. Dabei ergaben sich jedoch Hinweise auf einen Matrixeffekt (Kapitel 3.6).

Tabelle 3.7: Intensitätenverhältnisse von Fragmentionen.

mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM _{Säule})	SD (n = 8)	ohne chromatographische Trennung (Arbutin_3MRM)	SD (n = 57)
$I_{m/z108} : I_{m/z101} = 4,2$	($\pm 0,4$)	$I_{m/z108} : I_{m/z101} = 5,8$	($\pm 0,7$)
$I_{m/z161} : I_{m/z101} = 2,9$	($\pm 0,2$)	$I_{m/z161} : I_{m/z101} = 2,4$	($\pm 0,4$)
$I_{m/z108} : I_{m/z161} = 1,4$	($\pm 0,3$)	$I_{m/z108} : I_{m/z161} = 2,5$	($\pm 0,3$)

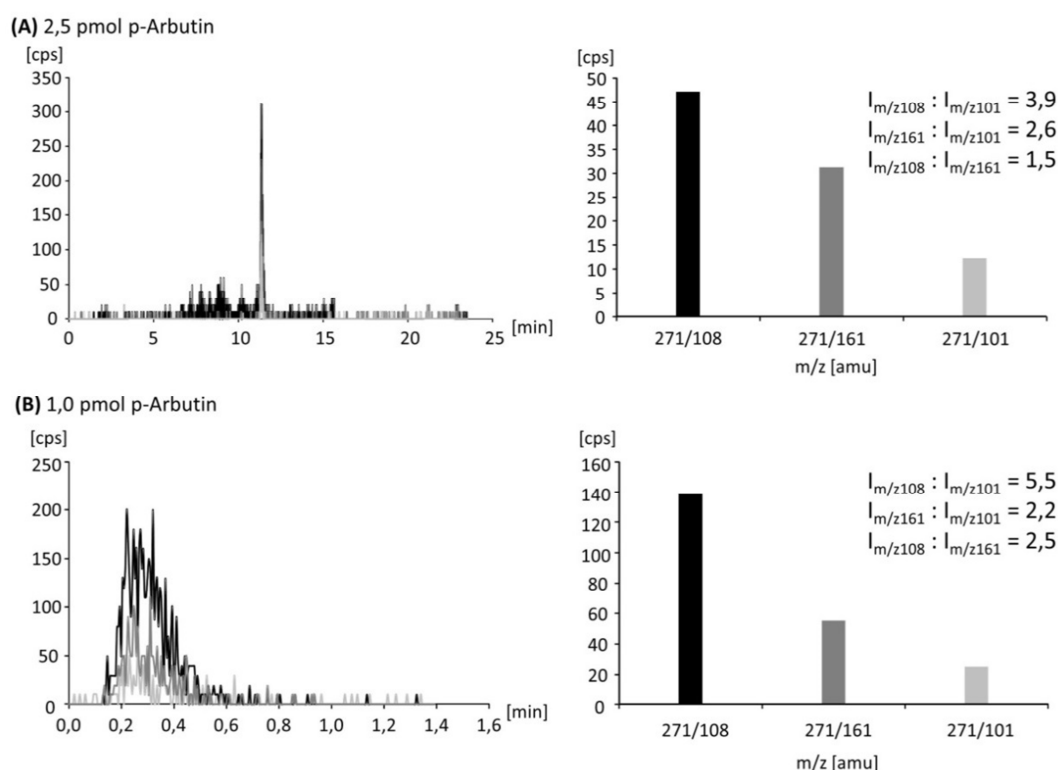


Abbildung 3.20: Massenspektrometrische Analyse von p-Arbutin.

Mit chromatographischer Trennung (Methode: Arbutin_3MRM_{Säule}) einer Referenzprobe wurde für p-Arbutin eine Retentionszeit von 11,4 Minuten ermittelt **(A)**. Bei der Methode Arbutin_3MRM wurde die Referenzprobe über eine Vorsäule ohne chromatographische Trennung appliziert **(B)**. Gezeigt sind repräsentative Chromatogramme von verwendeten Standards (links) mit den dazugehörigen Intensitäten der beobachteten Massenübergänge (rechts). Die zugehörigen Ionenverhältnisse der Fragmentionen sind angegeben.

Messungen von Enzymreaktionen mit Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) zeigten im Chromatogramm ein Signal bei einer Retentionszeit (R_t) von 11,4 Minuten (Abbildung 3.21 A). Die dazugehörigen Massenübergänge wiesen die für p-Arbutin charakteristischen Fragmentationen mit den erwarteten Intensitätenverhältnissen auf (Tabelle 3.7). Die Enzymassays mit Gesamtproteinextrakt aus pET15b-transformierten *E. coli* und untransformierten *E. coli* enthielten diese Substanz nicht (Abbildung 3.21 B und C). Als zusätzliche Kontrollen wurden das Fließmittel und die Reaktionsansätze ohne Gesamtproteinextrakt (aber mit UDP-Glucose bzw. -Galactose) mit der gleichen Methode analysiert (Abbildung 3.22). Weder das verwendete Fließmittel noch die Reaktionsansätze ohne Gesamtproteinextrakt wiesen die für p-Arbutin charakteristischen Massenübergänge auf. Damit kann mit der beschriebenen Vorgehensweise enzymatisch gebildetes p-Arbutin spezifisch und ohne Hintergrundsignale nachgewiesen werden. Daher wurde das Nachweisverfahren mit chromatographischer Trennung zur Analyse von Enzymassays von Gesamtproteinextrakten chimärer Glykosyltransferasen genutzt (Kapitel 3.6).

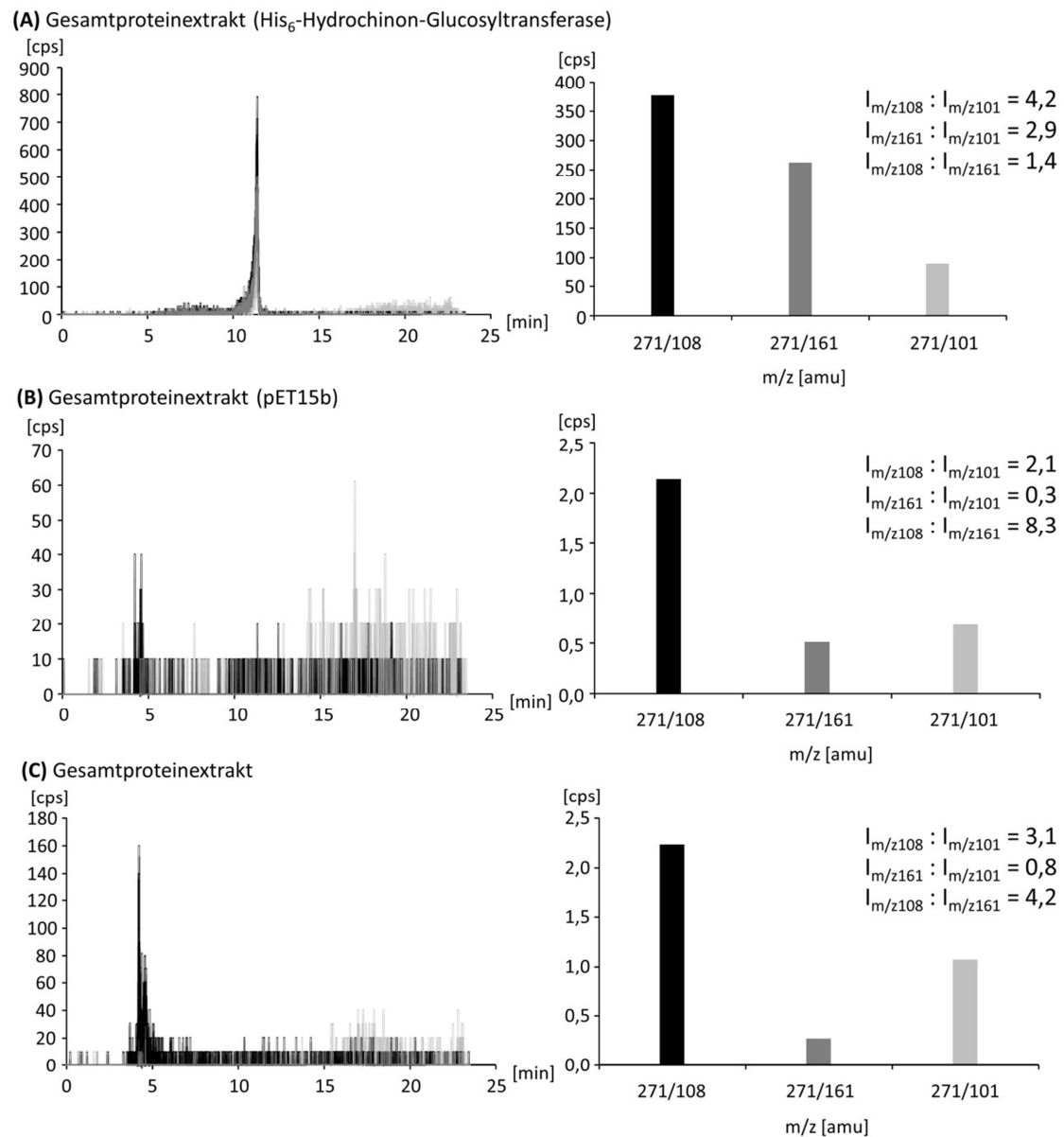


Abbildung 3.21: Nachweis der p-Arbutinbildung in Enzymreaktionen mit *E. coli* Gesamtproteinextrakten mittels HPLC-ESI-MS/MS.

Die Untersuchung von Gesamtproteinextrakten mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase **(A)**, des mit pET15b transformierten **(B)** und des untransformierten **(C)** Expressionsstammes wurde mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) durchgeführt. Links: Chromatogramme. Rechts: Intensitäten der beobachteten Massenübergänge zum Zeitpunkt 11,4 Minuten. Die Proteinexpression und die Extraktion wurden in Mikroplatten durchgeführt. Die gezeigten Tests wurden in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 μ M MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % (V/V) Glycerol mit 2 mM Hydrochinon, 2 mM UDP-Glucose und 10 μ l Gesamtproteinextrakt bei 43°C für 60 Minuten durchgeführt.

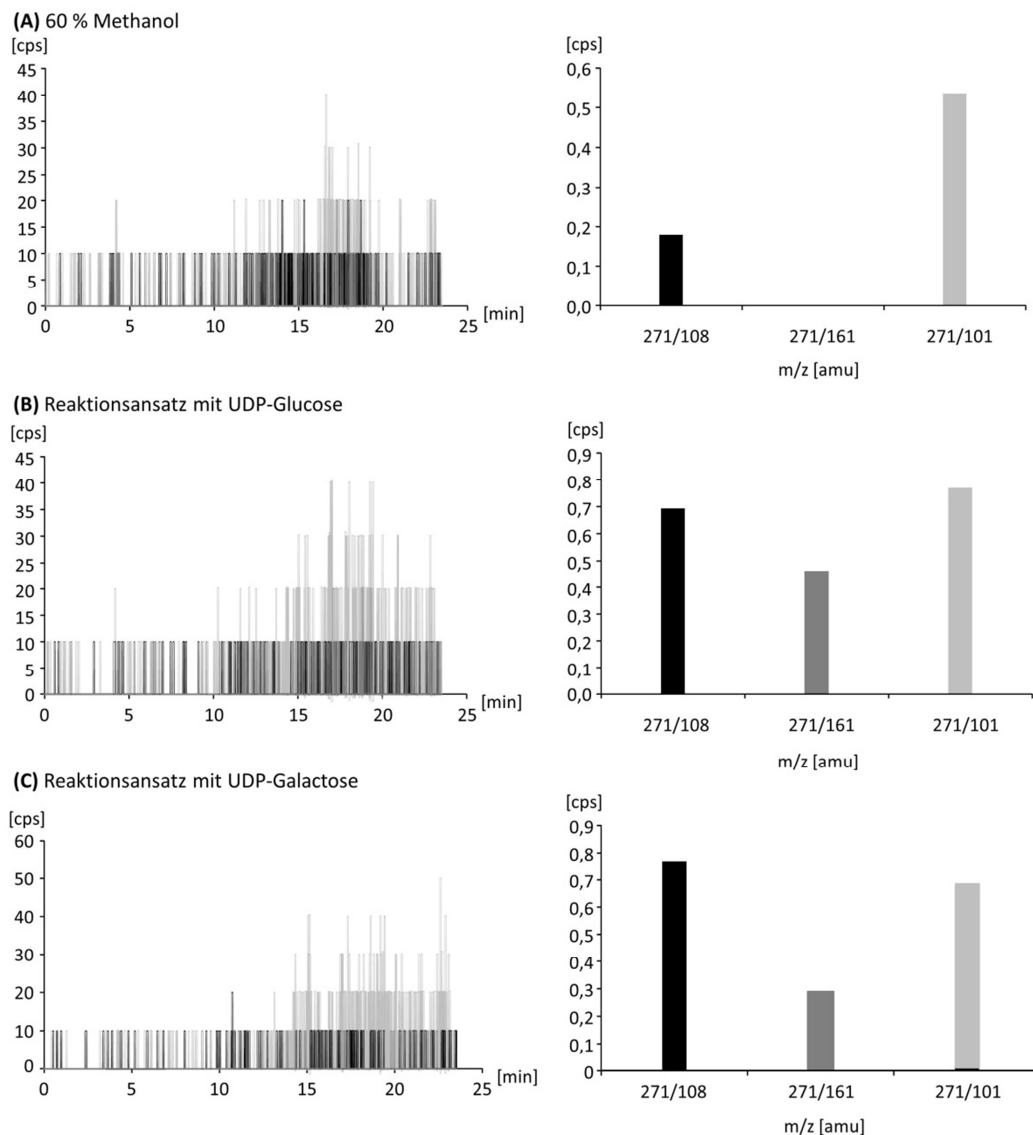


Abbildung 3.22: Massenspektrometrische Analyse von 60 % (V/V) Methanol und Reaktionsansätzen nach chromatographischer Trennung.

Chromatogramme (links) und Intensitäten der zum p-Arbutinnachweis gewählten Massenübergänge für $R_t = 11,4$ Minuten (rechts) von 60 % (V/V) Methanol **(A)**, Reaktionsansätzen ohne Gesamtproteinextrakt, aber mit 2 mM UDP-Glucose **(B)** oder 2 mM UDP-Galactose **(C)**. Die Ansätze enthielten zudem 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 μ M MnCl₂, 1 mM DTT, 5 % (V/V) Glycerol und 2 mM Hydrochinon. Vor der Messung wurden die Ansätze bei 43°C für 60 Minuten inkubiert.

Um in einem Hochdurchsatz-Screening die Anzahl der HPLC-ESI-MS/MS-Läufe zu reduzieren, sollte getestet werden, ob die zu untersuchenden Proben vor dem Aktivitätsnachweis gemischt werden können. Dies würde im Primär-Screening das gezielte Vereinigen von Proben nach einer vorher festgelegten Matrix ermöglichen. Ein Sekundär-Screening würde sich zur Identifizierung des aktiven Klonen anschließen. Zur Untersuchung der Empfindlichkeit des Nachweises der Bildung von p-Arbutin wurden im Enzymassay drei Gesamtproteinextrakte gemischt. Die Mischungen wurden auf zwei verschiedene Arten gebildet und untersucht. Zum einen wurden homogene Mischungen, bei denen drei unabhängig hergestellte Gesamt-

proteinextrakte mit je 10 µl zusammen gegeben wurden, analysiert (Abbildung 3.23). Dabei wurden entweder nur Gesamtproteinextrakte mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (Abbildung 3.23 A) oder nur Gesamtproteinextrakte von pET15b-transformierten *E. coli* (Abbildung 3.23 B) genutzt. Zum anderen wurden heterogene Mischungen durch Mischung eines aktiven Gesamtproteinextraktes (His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase) mit zwei inaktiven Gesamtproteinextrakten (pET15b-transformierten *E. coli*) hergestellt (Abbildung 3.24).

Die homogenen Mischungen wurden mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) (Abbildung 3.23) untersucht. Das p-Arbutin wurde in Proben der aktiven Mischungen nachgewiesen. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Einzelextrakte (Abbildung 3.21 A) zeigten sich für die Ergebnisse mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) identische Retentionszeiten und gleiche Massenübergänge. Proben mit heterogenen Mischungen wurden nur ohne chromatographische Trennung untersucht (Abbildung 3.24). Auch in diesen Proben wurde p-Arbutin durch die erwarteten Massenübergänge nachgewiesen. Damit war die Enzymaktivität auch in Reaktionsansätzen mit vereinigten Gesamtproteinextrakten (ein aktiver und zwei inaktive) nachweisbar. Die Ergebnisse zeigten, dass die Vereinigung von Gesamtproteinextrakten für ein Primär-Screening zwecks Probenreduktion prinzipiell möglich erscheint.

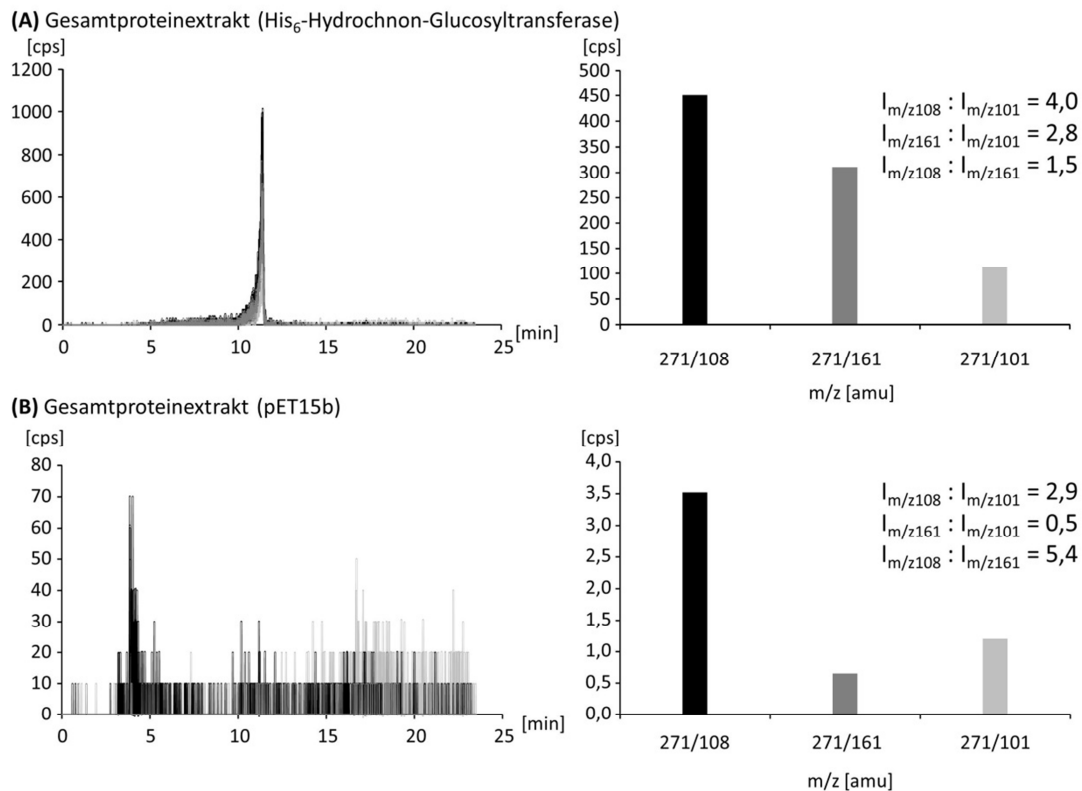


Abbildung 3.23: Nachweis der p-Arbutinbildung in Enzymreaktionen mit Gemischen von *E. coli*-Gesamtproteinextrakten (homogene Mischungen).

Enzymreaktionen mit Gesamtproteinextrakten mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase **(A)** oder mit Gesamtproteinextrakten mit pET15b transformierter *E. coli* **(B)** wurden mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) analysiert. Links: Chromatogramme. Rechts: Intensitäten der beobachteten Massenübergänge zum Zeitpunkt 11,4 Minuten. Die Proteinexpression und der Extraktgewinn wurden in Mikroplatten durchgeführt (Kapitel 2.5). Die gezeigten Tests wurden in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % (V/V) Glycerol mit 2 mM Hydrochinon, 2 mM UDP-Glucose und 10 µl Gesamtproteinextrakt bei 43°C für 60 Minuten durchgeführt.

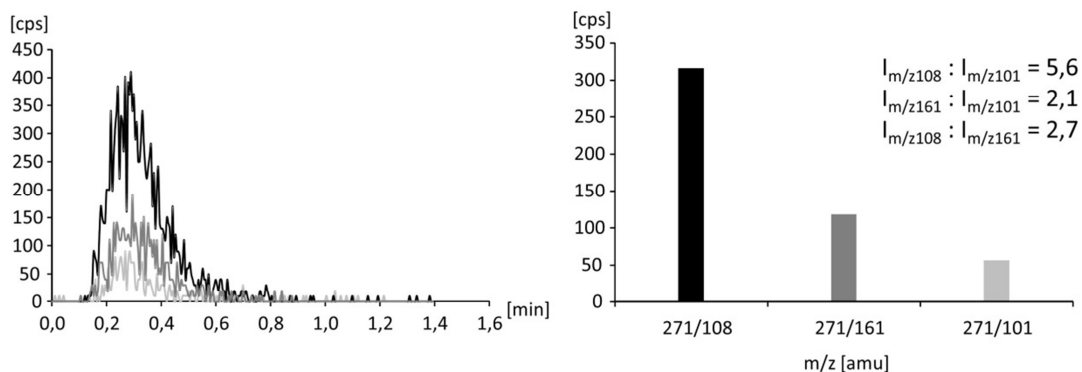


Abbildung 3.24: Nachweis der p-Arbutinbildung in Enzymreaktionen mit Gemischen von *E. coli*-Gesamtproteinextrakten (heterogene Mischungen).

Enzymreaktionen mit Mischungen von Gesamtproteinextrakten mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und Gesamtproteinextrakten mit pET15b transformierter *E. coli* wurden ohne chromatographische Trennung (Arbutin_3MRM) analysiert. Links: Chromatogramm. Rechts: Intensitäten der beobachteten Massenübergänge zum Zeitpunkt 0,25 Minuten. Die Proteinexpression und der Extraktgewinn wurden in Mikroplatten durchgeführt (Kapitel 2.5). Die gezeigten Tests wurden in 50 mM HEPES pH 7,5, 75 mM KCl, 50 µM MnCl₂, 1 mM DTT und 5 % (V/V) Glycerol mit 2 mM Hydrochinon, 2 mM UDP-Glucose und 10 µl Gesamtproteinextrakt bei 43°C für 60 Minuten durchgeführt.

3.5 Erzeugung chimärer Glykosyltransferasen

3.5.1 Entwicklung der „One-pot fusion“-PCR

Zur gezielten Kombination von ORF-Fragmenten der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase stand als Methode die OE-PCR [103] zur Verfügung. Auf der Basis der OE-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit die vereinfachte Variante „One-pot fusion“-PCR entwickelt [143]. Statt der drei in der OE-PCR separat durchgeführten PCRs, erfordert die „One-pot fusion“-PCR nur einen Reaktionsansatz und ist daher zeit- und kostensparend.

Die Komponenten einer Standard-PCR wurden für die „One-pot fusion“-PCR um eine zweite Matrize und das sogenannte Fusions-Oligonukleotid ergänzt. Dieses zusätzliche Oligonukleotid besteht aus komplementären Sequenzen beider Zielfragmente und führt in den ersten Zyklen der PCR zur Bildung des Megaoligonukleotides. Dabei wird das Fusions-Oligonukleotid vollständig verbraucht. In den weiteren Zyklen werden die DNA-Fragmente fusioniert und mit Hilfe der flankierenden Oligonukleotide vervielfältigt.

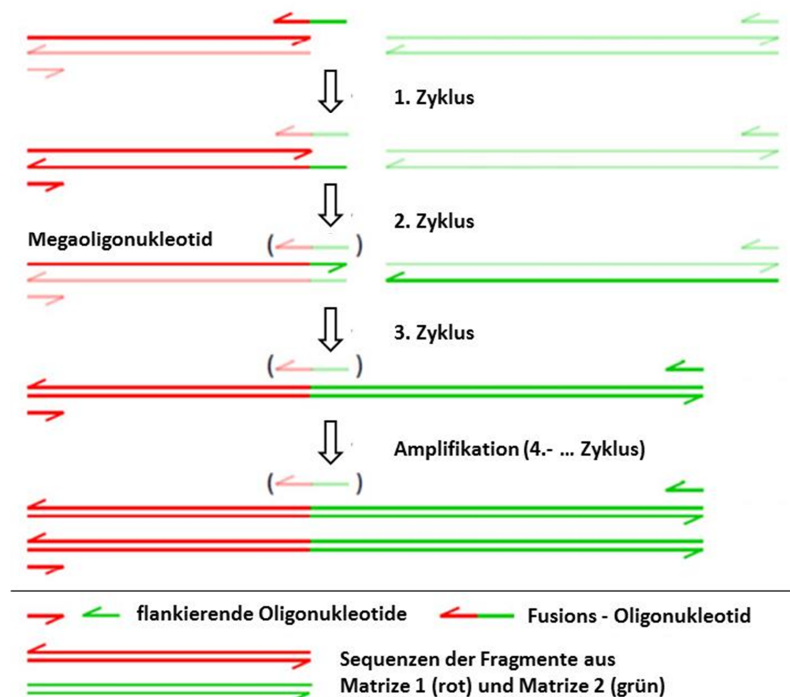


Abbildung 3.25: Schema der „One-pot fusion“-PCR zur Erzeugung beliebiger Fusionsgene.

Alle Komponenten der PCR werden zu Beginn in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Fusions-Oligonukleotid wird im Verlauf der Reaktion aufgebraucht, sodass für die Amplifikation der fusionierten Fragmente nur noch die flankierenden Oligonukleotide zur Verfügung stehen. Transparent dargestellte Fragmente sind in den jeweiligen Schritten nicht an der Reaktion beteiligt. Die unterschiedlichen Matrizen sind in rot und grün dargestellt (verändert nach [143]).

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde ein chimärer ORF aus der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase erstellt. Für die Optimierung der spezifischen Produktbildung wurden Konzentrationen von 0,001 - 0,2 μ M des Fusions-Oligonukleotides getestet. Die Wahl der Konzentration des Fusions-Oligonukleotides im Verhältnis zu den Matrizen bzw. den flankierenden Oligonukleotiden hatte einen großen Einfluss auf die Produktbildung. Es zeigte sich, dass mit der Verwendung von 0,01 - 0,04 μ M die Ausbeute des Produktes am höchsten war (Abbildung 3.26). Die versuchsweise durchgeführte Fusion des ORF der Hydrochinon-Glucosyltransferase mit dem ORF einer Hydrolase (*acIR*, *AcIR*-Protein) aus *Streptomyces galilaeus* zeigte, dass auch GC-reiche Fragmente mit der Methode verknüpft werden können (Abbildung 3.26).

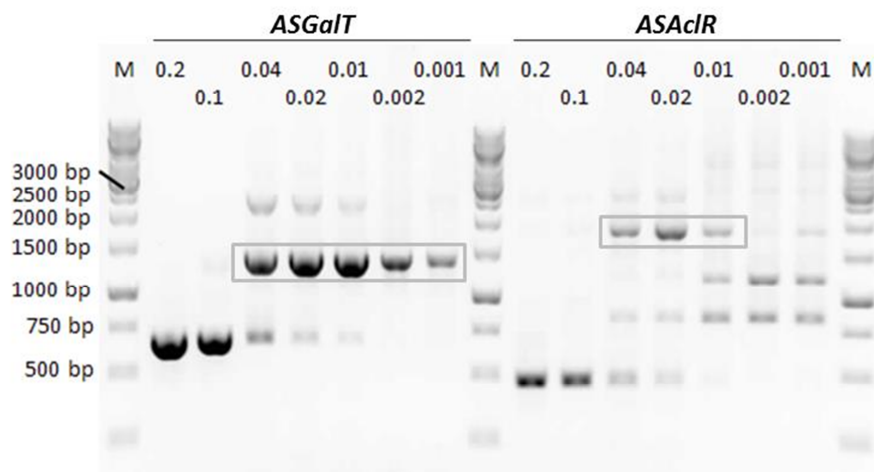


Abbildung 3.26: Elektrophoretische Trennung mittels „One-pot fusion“-PCR fusionierter DNA zur Bestimmung einer geeigneten Fusions-Oligonukleotid-Konzentration.

Die Größe der Produkte wurde in einem Agarosegel (1 %) überprüft. Die Konzentration der Fusions-Oligonukleotide ist oberhalb der Gele angegeben. Das Produkt von *ASGalT* hatte eine Größe von 1.353 bp, das von *ASAcIR* von ca. 1.900 bp. Die Reaktionsbedingungen sind unter Kapitel 2.3.2 beschrieben. **M**, 2,0 μ g Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

3.5.2 Anwendung der „One-pot fusion“-PCR

Die neu entwickelte „One-pot fusion“-PCR wurde zur Fusion definierter DNA-Fragmente für die N-terminale Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase mit Fragmenten für die C-terminale Domäne der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase zur Amplifikation von *AS_{X+Y}GalT*-cDNAs verwendet. Der Fusionspunkt der chimären cDNA wurde mit X+Y beschrieben. X und Y stehen für die Position der Aminosäure am Fusionspunkt des kodierten Proteins, wobei Zuckerakzeptor-Domäne und Zuckerdonor-Domäne jeweils mit der gesamten Linkersequenz eingehen. X gibt die Position der letzten Aminosäure des N-terminalen Fusionspartners an, identifiziert also die C-terminale Aminosäure der gewünschten Zuckerakzeptor-Domäne einschließlich Linkersequenz. Y benennt die Position der ersten Aminosäure des C-

terminalen Fusionspartners relativ zur ersten (N-terminalen) Aminosäure seiner Linker-Region. Um eine geeignete Fusionsstelle zu finden, wurden unterschiedliche Fusionspunkte gewählt. Für die Konstruktion der pET15b- AS_{x+y} GaIT-Plasmide wurden mittels PCR 20 verschiedene Fusionen mit je einem individuellen Fusions-Oligonukleotid (Tabelle 3.8) und den Oligonukleotiden P1/P4 hergestellt (Tabelle 2.4). Das erwartete Produkt hatte eine Größe von 1.353 bp. Abbildung 3.27 zeigt die elektrophoretische Trennung der mit dieser PCR hergestellten Produkte. Nach dem Verdau der Produkte mit *Bam*HI und *Nde*I erfolgte die Ligation mit dem *Bam*HI/*Nde*I-verdaulichem pET15b-Vektor. Die Identität der Konstrukte wurde durch Sequenzierung bestätigt.

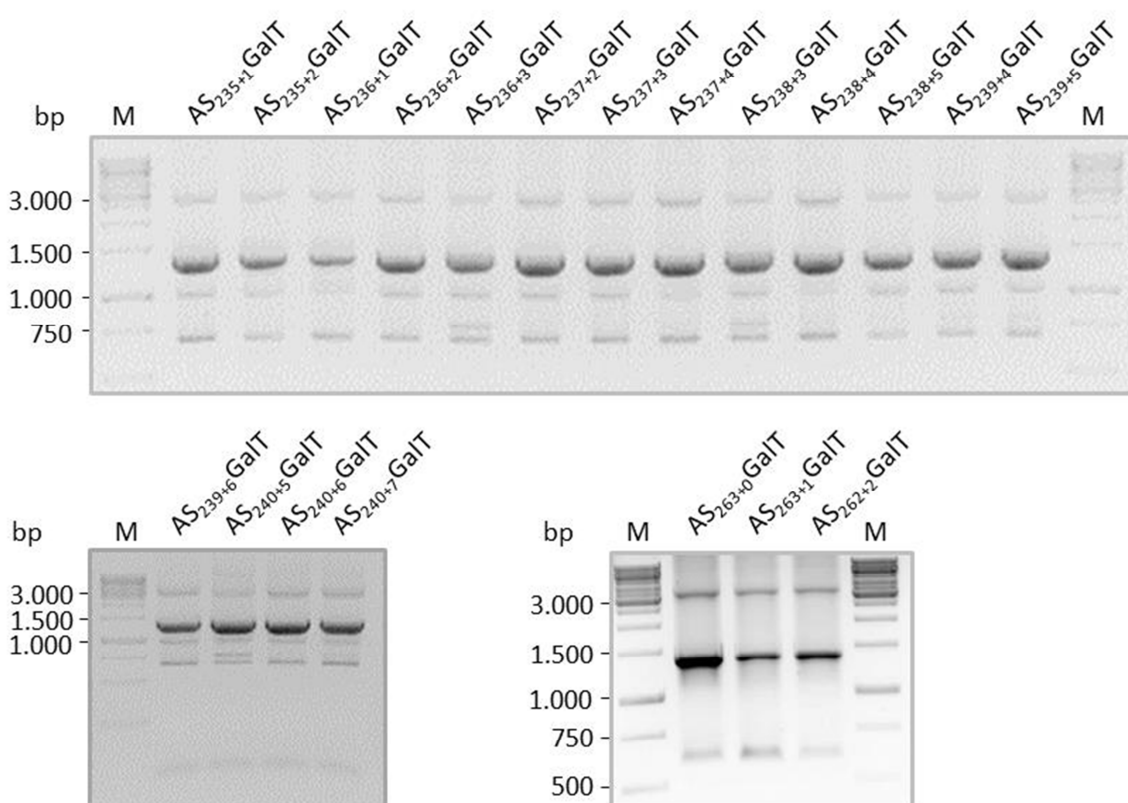


Abbildung 3.27: Elektrophoretische Trennung der PCR-Fragmente des Typs AS_{x+y} GaIT.

Die Größe der AS_{x+y} GaIT-Produkte aus der „One-pot fusion“-PCR wurde in einem Agarosegel (1 %) überprüft. Das Produkt hatte eine Größe von 1.353 bp. Die PCR wurde, wie in Tabelle 2.11 angegeben, durchgeführt. **M**, 2,0 µg Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

Tabelle 3.8: Durch „One-pot fusion“-PCR erzeugte Konstrukte für die Expression chimärer Glykosyltransferasen.

Der N-terminale Teil der Chimären entstammt der Hydrochinon-Glycosyltransferase (Aminosäuren 1 - 235 + 0 - 28 Aminosäuren Linker-Region). Der C-terminale Teil der Chimären entstammt der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (0 - 30 Aminosäuren Linker-Region + Aminosäuren 268 - 451). Die Chimären haben 449 - 451 Aminosäuren, davon 28 - 31 Aminosäuren Linker-Region.

Konstrukt	Fusion-Oligonukleotid	chimäre Proteine	
		N-terminal	C-terminal
AS ₂₃₅₊₁ GalT	P12	1-235	238-451
AS ₂₃₅₊₂ GalT	P13	1-235	239-451
AS ₂₃₆₊₁ GalT	P14	1-236	238-451
AS ₂₃₆₊₂ GalT	P15	1-236	239-451
AS ₂₃₆₊₃ GalT	P16	1-236	240-451
AS ₂₃₇₊₂ GalT	P17	1-237	239-451
AS ₂₃₇₊₃ GalT	P18	1-237	240-451
AS ₂₃₇₊₄ GalT	P19	1-237	241-451
AS ₂₃₈₊₃ GalT	P20	1-238	240-451
AS ₂₃₈₊₄ GalT	P21	1-238	241-451
AS ₂₃₈₊₅ GalT	P22	1-238	242-451
AS ₂₃₉₊₄ GalT	P23	1-239	241-451
AS ₂₃₉₊₅ GalT	P24	1-239	242-451
AS ₂₃₉₊₆ GalT	P25	1-239	243-451
AS ₂₄₀₊₅ GalT	P26	1-240	242-451
AS ₂₄₀₊₆ GalT	P27	1-240	243-451
AS ₂₄₀₊₇ GalT	P28	1-240	244-451
AS ₂₆₂₊₂ GalT	P11	1-262	266-451
AS ₂₆₃₊₀ GalT	P9	1-263	268-451
AS ₂₆₃₊₁ GalT	P10	1-263	267-451

Die durch die AS_{X+Y}GalT-Konstrukte kodierten Proteine unterschieden sich in dem Anteil der Hydrochinon-Glycosyltransferase und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase am Linkerpeptid (Tabelle 3.8, Abbildung 3.28). Die Verlängerung bzw. Verkürzung erfolgte dabei im Bereich der ersten bzw. letzten fünf Aminosäuren des Linkerpeptides.

```

      235
AS   .PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDDQPRG.
      1 (=238)
GalT .GPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS235+1GalT .PGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS235+2GalT .P-PFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS236+1GalT .PIGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS236+2GalT .PI-PFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS236+3GalT .PI--FNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS237+2GalT .PIG-PFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS237+3GalT .PIG--FNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS237+4GalT .PIG---NLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS238+3GalT .PIGP--FNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS238+4GalT .PIGP---NLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS238+5GalT .PIGP----LTTTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS239+4GalT .PIGPL---NLTTTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS239+5GalT .PIGPL----LTTTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS239+6GalT .PIGPL-----TTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS240+5GalT .PIGPLI----LTTTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS240+6GalT .PIGPLI-----TTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.
AS240+7GalT .PIGPLI-----TTPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGS.

AS263+0GalT .PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDDQPRGS.
AS263+1GalT .PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDDQPRGS.
AS262+2GalT .PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDDQPR-PGS.

```

Abbildung 3.28: Ausschnitt der Aminosäuresequenz chimärer Glykosyltransferasen des Typs AS_{x+y}GalT.

Die Aminosäuren der Linker-Region der Hydrochinon-Glucosyltransferase (AS) sind in grün, die der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (GalT) in rot dargestellt. In grau ist die jeweils flankierende Aminosäure der Zuckerakzeptor- bzw. Zuckerdonor-Domäne angegeben. Das Fehlen einer Aminosäure ist durch einen Strich gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die zur Bildung der α -Helices in der Linker-Region beitragen, sind unterstrichen.

3.5.3 Zufällige Fusion mittels ITCHY-Technik

Zur Herstellung chimärer Proteine mit zufällig generierten Fusionspunkten wurde mittels der ITCHY-Technik eine Bibliothek (pET15b_ASGalT_{Chim}-Plasmide) chimärer cDNAs erzeugt [96, 102]. Das hierfür notwendige Ausgangsplasmid wurde durch PCR und Ligation erzeugt. Das DNA-Fragment für den Hydrochinon-Glucosyltransferase-Anteil wurde aus pET15b_AS_{full-length} mit den Oligonukleotiden P1/P8 synthetisiert. Der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase-Anteil wurde aus pET15b_GalT_{full-length} und den Oligonukleotiden P3/P4 synthetisiert. Nach separatem *Bam*HI/*Nde*I Verdau wurden die DNA-Fragmente in einen *Bam*HI/*Nde*I verdauten pET15b-Vektor ligiert. Der resultierende Vektor pET15b_ASGalT_Bib (Tabelle 2.3) kodiert für die Aminosäuren 1 bis 263 der Hydrochinon-Glucosyltransferase und die Aminosäuren 238 bis 451 der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase. Für eine spätere Linearisierung wurde eine *Xho*I-Erkennungssequenz zwischen beide kodierenden Elemente eingefügt (Abbildung 3.29). Die Sequenzierung des Vektors bestätigte die Identität des Konstruktes.

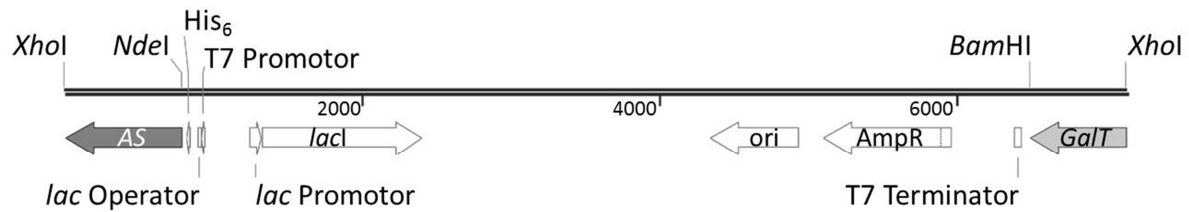


Abbildung 3.29: Lineare Darstellung der Vektorkarte von pET15b_ASGalT_Bib.

Die Linearisierung des Plasmides (7.140 bp) mit *XhoI* führt zur Öffnung in der künstlichen Linker-Region zwischen den für die Glykosyltransferase-Domänen kodierenden Bereichen. Die aus dieser Restriktion resultierenden 5'-Überhänge sind für die Aktivität der Exonuklease III notwendig. *BamHI* und *NdeI*, Erkennungssequenzen der in der Klonierung genutzten Restriktionsenzyme. His₆, Hexahistidin-Tag; AS, cDNA der N-terminalen Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase mit Linker-Region; *GalT*, cDNA der C-terminalen Domäne der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase mit Linker-Region; *lacI*, cDNA für den Repressor des lac-Operons; AmpR, cDNA für die Ampicillin-Resistenz; ori, pBR322 Replikationsursprung. (Abbildung erstellt mit SnapGene Version 3.0.3, snapgene.com).

Die Konstruktion der pET15b_ASGalT_{Chim}-Plasmide kann in drei Schritte gegliedert werden (Abbildung 1.10): 1. Linearisierung von pET15b_ASGalT_Bib durch *XhoI*-Verdau, 2. Bearbeitung durch Exonuklease III und S1-Nuklease und 3. Zyklisierung durch Ligase. Für die Erzeugung unterschiedlicher Größen des Linkers wurden während des 2. Schrittes zeitabhängig Proben entnommen.

Zur Untersuchung der Exonuklease III-Aktivität wurden pET15b_ASGalT_{Chim}-Plasmide direkt nach Zugabe der Exonuklease III, 15 Sekunden oder fünf Minuten danach entnommen, zyklisiert und mittels PCR und Sequenzierung untersucht. Anhand der Ergebnisse (Tabelle 3.9) wurde die Inkubationsdauer von pET15b_ASGalT_Bib mit Exonuklease III auf zehn Minuten und das Intervall zur Probennahme auf 20 Sekunden festgelegt.

Tabelle 3.9: Zusammensetzung der Linker-Regionen in Abhängigkeit von der Dauer der Exonuklease III-Behandlung.

Zum Vergleich ist die Länge der Linker-Regionen der Hydrochinon-Glucosyltransferase (AS) und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (GalT) angegeben (grau). Im Aktivitätsassay (HPLC-DAD) war nach Expression der Chimäre keine Aktivität detektierbar.

Probennahme	ORF	Linker-Anteil [bp]		
		AS	GalT	Σ
		84	93	174
0 Sekunden	ja	81	87	168
15 Sekunden	nein	73	85	158
5 Minuten	ja	48	57	105

Der mittels ITCHY-Technik hergestellte Plasmid-Pool wurde anschließend in *E. coli* transformiert. Für eine Analyse der erzeugten Linker-Regionen wurden die pET15b_ASGalT_{Chim}-Plasmide aus 58 *E. coli*-Klonen sequenziert. Innerhalb der sequenzierten Konstrukte fanden sich sechs Gruppen von zwei bis fünf Plasmiden mit identischer cDNA, sodass insgesamt 47

verschiedene cDNAs identifiziert wurden (Tabelle 3.10). Eine Gruppe von Plasmiden (Nr. 1 - 3) war trotz der Anwendung der ITCHY-Technik gegenüber dem Ausgangskonstrukt pET15b_-ASGalT_Bib unverändert und enthielt daher die vollständige Linker-Region aus beiden cDNAs (AS+GalT) mit durchgehendem Leserahmen. In den verbleibenden 46 verschiedenen cDNAs traten 16 unterschiedliche ORFs auf.

Tabelle 3.10: Sequenzierte Konstrukte aus der ITCHY-Technik.

Die farbig hinterlegten Konstrukte bilden Gruppen mit identischer cDNA. AS = Hydrochinon-Glucosyltransferase; GalT = Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase.

Konstrukt	ORF	Linker-Anteil [bp]			Konstrukt	ORF	Linker-Anteil [bp]		
		AS	GalT	Σ			AS	GalT	Σ
1 - 3	ja	84	93	177	33	ja	55	77	132
4	nein	82	90	173	34	nein	63	65	128
5	ja	78	87	165	35	ja	62	64	126
6, 7	nein	78	86	164	36, 37	nein	57	67	124
8	ja	74	88	162	38, 39	ja	57	66	123
9	nein	77	83	160	40	nein	50	71	121
10	ja	77	82	159	41	ja	84	36	120
11	nein	78	80	158	42	nein	49	66	115
12	ja	75	81	156	43	nein	54	59	113
13	nein	77	75	152	44	ja	52	59	111
14	nein	80	71	151	45, 46	nein	49	60	109
15	nein	77	72	149	47	nein	46	63	109
16	ja	67	80	147	48	ja	46	59	105
17	nein	72	74	146	49	ja	52	53	105
18	nein	75	70	145	50	nein	45	58	103
19, 20	nein	77	66	143	51	nein	49	54	103
21	nein	73	69	142	52	nein	44	59	103
22 - 26	ja	63	78	141	53	nein	52	51	103
27	nein	75	65	140	54	nein	50	50	100
28	nein	72	68	140	55	ja	30	60	90
29	nein	75	64	139	56	nein	36	53	89
30	nein	78	58	136	57	ja	33	54	87
31	nein	70	66	136	58	nein	18	61	79
32	ja	65	70	135					

Die Länge der Linker-Regionen der 58 untersuchten Konstrukte variierte zwischen 79 und 177 Basenpaaren, in 54 dieser Konstrukte lag sie zwischen 100 und 177 Basenpaaren. Damit war dieser Bereich bei den meisten erzeugten Konstrukten deutlich länger als in den Ausgangs-cDNAs für die Hydrochinon-Glucosyltransferase oder Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase. In vier Konstrukten (Nr. 55 - 58 Tabelle 3.10) war die Länge des Bereiches vergleichbar mit der Länge in den der Ausgangs-cDNAs für die Hydrochinon-Glucosyltransferase oder Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase. Diese Konstrukte besaßen alle einen höheren Anteil des für den Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase-Linker kodierenden Bereichs (Abbildung 3.30).

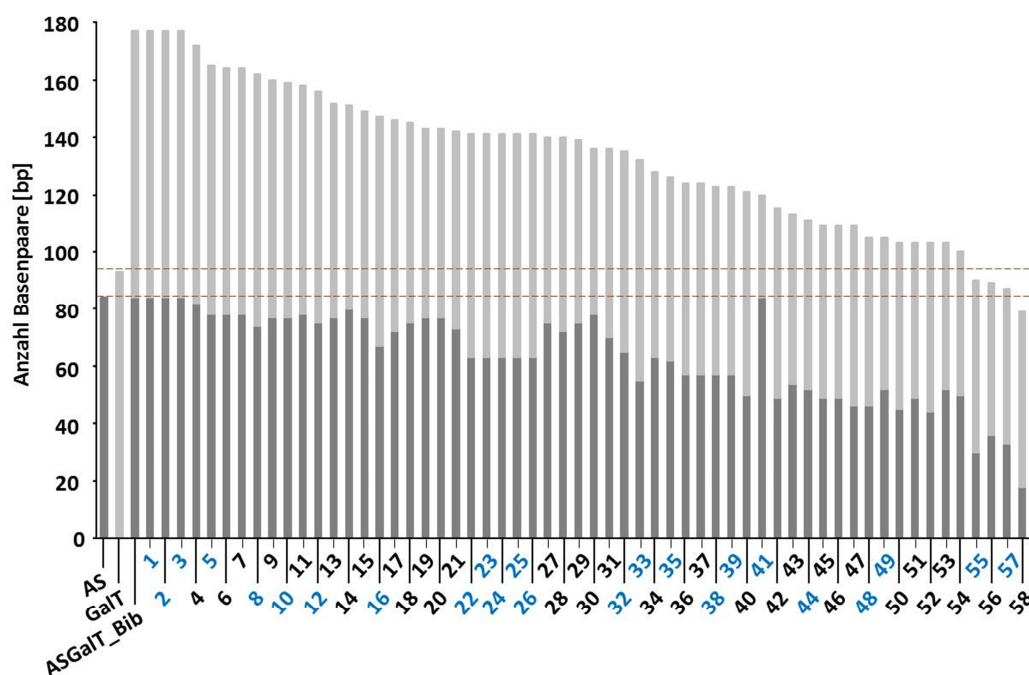


Abbildung 3.30: Länge und Zusammensetzung chimärer Linker-Regionen nach Anwendung der ITCHY-Technik.

Zusammensetzung der Linker-Region von 58 sequenzierten pET15b_ASGalT_{Chim}-Plasmiden (1 - 58). In blau sind die Konstrukte mit ORF markiert. Die Größe der Hydrochinon-Glucosyltransferase-(AS)-Linker-Region ist in dunkelgrau und die Größe der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase-(Galt)-Linker-Region ist in hellgrau gezeigt. Die Größenordnung der natürlichen Linker-Region ist mit braunen unterbrochenen Strichen markiert. ASGalT_Bib zeigt die Größe der chimären Linker-Region des Konstruktes ASGalT_Bib.

Nur die Konstrukte 1 - 3 enthielten die gesamte Linker-Region der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (Abbildung 3.31). Die Chimäre 41 besaß, neben den Konstrukten 1, 2 und 3, als einzige den gesamten Hydrochinon-Glucosyltransferase-Linker.

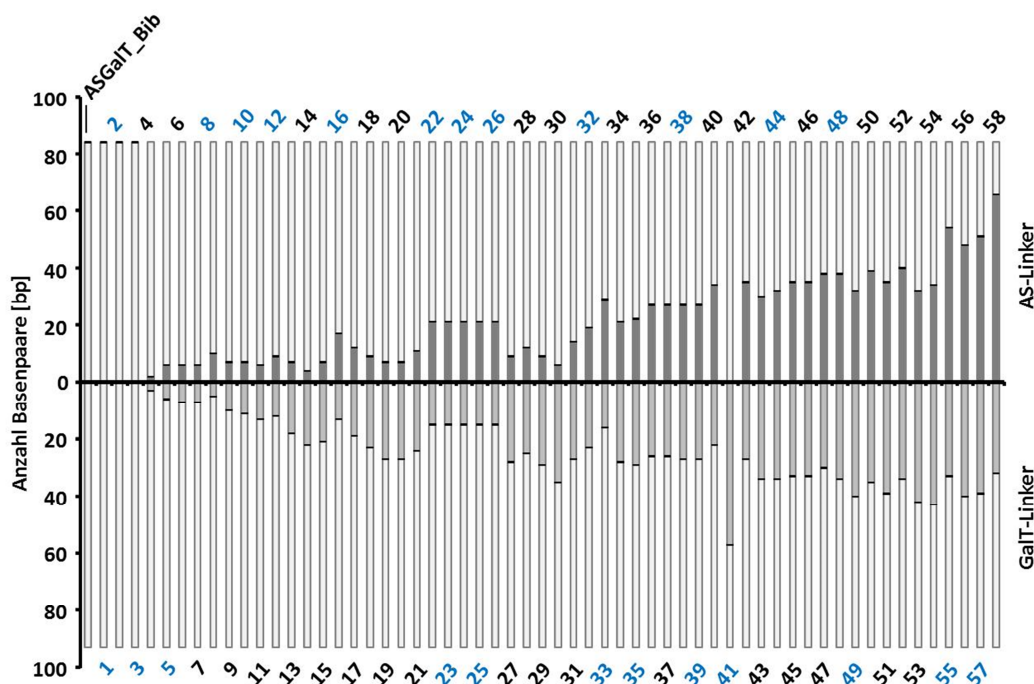


Abbildung 3.31: Mittels ITCHY-Technik entfernte Basen in der chimären Linker-Region.

Die Linker-Region von 58 pET15b_ASGalT_{Chim}-Plasmiden (1-58) wurde sequenziert. Der aus der Hydrochinon-Glucosyltransferase-(AS)-DNA entfernte Linker-Anteil ist in dunkelgrau und der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase-(GalT)-DNA entfernte Linker-Anteil ist in hellgrau gezeigt. Der erhaltene Teil ist als heller Balken gezeigt. In blau sind die Konstrukte mit ORF markiert. ASGalT_Bib zeigt die Größe der chimären Linker-Region des Ausgangskonstruktes ASGalT_Bib.

Für die Konstrukte mit neuen, intakten Leserahmen wurden die Aminosäuresequenzen der Linker-Regionen der chimären Proteine abgeleitet (Abbildung 3.32). Die Konstrukte 8 und 35 hatten eine durch Punktmutationen veränderte Sequenz im Linker-Bereich (Abbildung 3.32). Die Aminosäuren der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase, die zur Bildung der α -Helix in der Linker-Region beitragen, waren in allen Konstrukten vorhanden. Der Hydrochinon-Glucosyltransferase-Linker war bei den Konstrukten 44, 48, 49, 55 und 57 soweit reduziert, dass die Aminosäuren, die zur Bildung der α -Helix beitragen, nicht mehr vorhanden waren.

Die Ergebnisse zeigten, dass mit Hilfe der ITCHY-Technik mühelos eine große Anzahl chimärer Gene mit unbekanntem Fusionspunkt generiert werden kann. Demgegenüber steht der hohe Aufwand bei der Expression, der Herstellung der Gesamtproteinextrakte und den Enzymassays. Die große Anzahl chimärer Gene macht ein verlässliches Hochdurchsatz-Screening für den Aktivitätsnachweis notwendig.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
ASGaLT_Bib	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
1	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
2	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
3	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
5	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
8	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDH-----PFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
10	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
12	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRGLEGPFNLTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
16	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLD-----LTTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
22	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLD-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
23	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLD-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
24	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLD-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
25	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLD-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
32	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLD-----PPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
33	.PIGPLIRADSSSKVDDCECL-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
35	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLK-----PPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
38	.PIGPLIRADSSSKVDDCECL-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
39	.PIGPLIRADSSSKVDDCECL-----TTPPPSANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
41	.PIGPLIRADSSSKVDDCECLKWLDQPRG-----GCIAWLDKQEPGSS.
44	.PIGPLIRADSSSKVDDCEC-----ANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
48	.PIGPLIRADSSSKVDDC-----ANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
49	.PIGPLIRADSSSKVDDCEC-----ANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
55	.PIGPLIRADSSS-----ANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.
57	.PIGPLIRADSSS-----SANITDEYGCIAWLDKQEPGSS.

Abbildung 3.32: Abgeleitete Aminosäuresequenzen der Linker-Regionen der chimären Proteine (ASGaLT_{chim}).

ASGaLT_Bib zeigt die Linker-Region, die sich aus dem Ausgangsplasmid ergibt (Schwarz: in Folge der Klonierung eingeführte Aminosäuren, Grün: Linker-Region der Hydrochinon-Glucosyltransferase, Rot: Linker-Region der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase). Jeweils eine Aminosäure der Domäne ist in Grau angegeben. Aminosäureaustausche sind dunkelgrün hinterlegt. Aminosäuren, die zur Bildung der α -Helices in der Linker-Region beitragen, sind unterstrichen. (Sequenzen erstellt mit www.expasy.org/translate/).

3.6 Aktivität chimärer Glykosyltransferasen

Zunächst wurde das Klon Screening mit Bromthymolblau auf Filterpapier eingesetzt, um mittels der ITCHY-Technik generierte Klone auf Glykosyltransferase-Aktivität zu untersuchen. Klone, deren Farbänderung zu Gelbgrün auf eine Glykosyltransferase-Aktivität hinwies, wurden genauer analysiert. Der Produktnachweis in Enzymreaktionen mittels HPLC-DAD verlief negativ. Da die Aktivität also nicht bestätigt werden konnte, wurde diese Nachweismethode nicht weiter für das Hochdurchsatz-Screening chimärer Glykosyltransferasen eingesetzt.

Weitere mittels der ITCHY-Technik generierte chimäre Konstrukte wurden Verfahren zum Nachweis einer pH-Änderung in Mikroplatten (Kapitel 3.4.3) unterzogen wobei auch der Zellaufschluss in Mikroplatten (Kapitel 2.5.2) durchgeführt wurde. Für Enzymassays kamen Gesamtproteinextrakte zum Einsatz. Als Kontrollen wurden Gesamtproteinextrakte von pET15b_AS_{fulllength}, pET15b oder der Extraktionspuffer genutzt (Tabelle 3.11). Die Proben A1, A2, A3, E3, B4, C4 und F4 wurden visuell im Vergleich zu den Kontrollen nach 60 Minuten als aktiv bewertet (Abbildung 3.33). Die Proben A4, D4, E4, G4 und H4 wurden als negativ bewertet.

Tabelle 3.11: Positiv- und Negativkontrollen im Screening von Gesamtproteinextrakten mit Bromthymolblau.
Der Aktivitätsnachweis der Gesamtproteinextrakte ist in Abbildung 3.33 gezeigt.

Vertiefung	Kontrolle		UDP-Zucker	Zuckerakzeptor
A11	pET15b_AS _{fulllength}	negativ	Galactose	Hydrochinon
B11	pET15b_AS _{fulllength}	positiv	Glucose	Hydrochinon
C11	pET15b	negativ	Galactose	Hydrochinon
D11	pET15b	negativ	Glucose	Hydrochinon
E11	Extraktionspuffer	negativ	Glucose	Hydrochinon
H10	Extraktionspuffer	negativ	Galactose	Hydrochinon

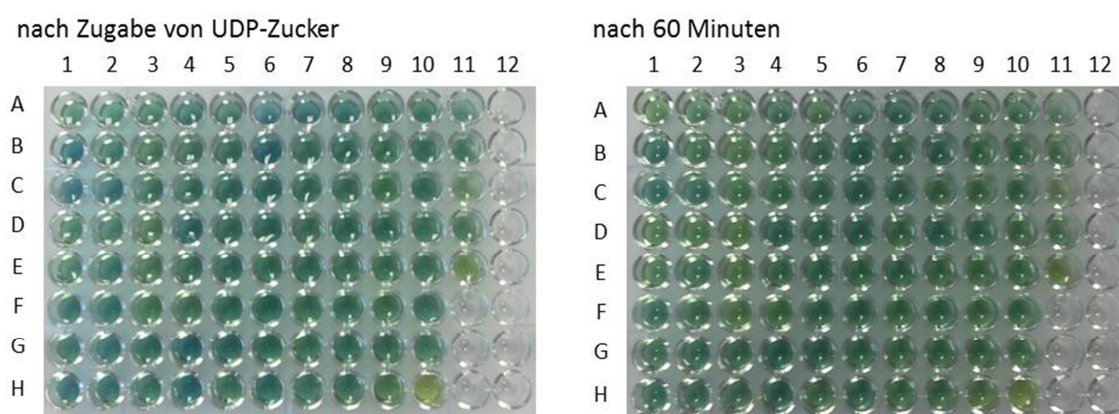


Abbildung 3.33: Aktivitätsnachweis von His₆-ASGalT_{chim} mit Bromthymolblau in *E. coli*-Gesamtproteinextrakt.
Es wurden 8,0 µl Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Die Reaktionslösung enthielt 2,0 mM Tris/HCl pH 7,0 mit 0,11 mM Bromthymolblau, 2,0 mM Hydrochinon und 2 mM UDP-Zucker. Die Reaktionsansätze wurden bei 37°C für 60 Minuten im Mikroplatten-Photometer inkubiert. Als Kontrollen wurden pET15b_AS_{fulllength}, pET15b oder Extraktionspuffer III (Kapitel 2.5.2) verwendet (siehe Tabelle 3.11).

Die Reaktionsansätze wurden anschließend mittels HPLC-DAD auf die Anwesenheit von Hydrochinonglykosiden untersucht. Für keine der Chimäre wurde eine Produktbildung nachgewiesen. Die Negativkontrollen mit pET15b oder Extraktionspuffer enthielten kein Hydrochinonglykosid. Bei Verwendung von Extrakten mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (Positivkontrolle) wurde p-Arbutin, wie erwartet, nur in Ansätzen mit UDP-Glucose nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die visuelle Auswertung der Farbänderung zu falsch positiven Ergebnissen führt. Damit stellt dieses Verfahren keine verlässliche Methode für einen Aktivitätsnachweis im Hochdurchsatz dar.

In einem vorläufigen Screening wurden insgesamt etwa 3.880 Extrakte chimärer Glykosyltransferasen in Enzymassays mit Produktnachweis über HPLC-ESI-MS/MS untersucht. Die chimären Konstrukte wurden dafür überwiegend mit der ITCHY-Technik hergestellt. Enzymreaktionen von 3.570 Extrakten aus *E. coli* mit Konstrukten des Typs ASGalT_{chim} wurden überwiegend als Mischungen ohne chromatographische Trennung (Arbutin_3MRM) untersucht (Tabelle 3.12), da es mit dieser Methode möglich war Proben in kurzer Zeit im Hochdurch-

satz zu untersuchen. Das Screening führte nicht zur Identifizierung von Klonen mit Glykosyltransferase-Aktivität.

Daraufhin wurden Experimente zur Prüfung auf einen eventuellen Matrixeffekt durchgeführt. Dazu wurde einer Enzymreaktion, die Gesamtproteinextrakt (30 µl) aus mit pET15b transformierten *E. coli* statt der mit Expressionskonstrukten transformierten *E. coli* enthielt, nach dem stoppen mit Methanol das Produkt p-Arbutin in einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt (entsprechend 1,5 % Substratumsatz in einer Enzymreaktion mit 2 mM Hydrochinon). Nach Aufarbeitung der Proben wie im Screening war per HPLC-ESI-MS/MS ohne chromatographische Trennung kein p-Arbutin detektierbar. Das eingespritzte Volumen entsprach einer Menge von 100 pmol p-Arbutin. Der p-Arbutin-Standard ohne Matrix war hingegen noch mit 0,1 pmol nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Matrix den Nachweis von p-Arbutin stört. Kontrollreaktionen mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (10 µl Gesamtproteinextrakt) wurden standardmäßig vor der HPLC-ESI-MS/MS-Analyse 1:1250 verdünnt (Kapitel 2.6.2.3), um eine Überladung mit p-Arbutin zu vermeiden. In den Kontrollreaktionen war p-Arbutin aber immer nachweisbar, unabhängig davon, ob diese Verdünnung vorgenommen wurde oder nicht. Das heißt, die Aktivität der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase war trotz Matrixeffekt nachweisbar. Der Matrixeffekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genauer untersucht werden. Aus dem Screening lässt sich aber schließen, dass keiner der untersuchten Klone eine Glykosyltransferase exprimiert, die eine quantitativ mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase vergleichbare Enzymaktivität aufwies. Bevor eine Aussage über mögliche Enzyme mit geringerer Aktivität als die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase gemacht werden kann, muss der Matrixeffekt genauer untersucht werden.

Weitere Enzymreaktionen von 267 Extrakten des gleichen Typs wurden mit chromatographischer Trennung (Arbutin_3MRM_{Säule}) analysiert. Mit dieser Methode wurden auch Enzymreaktionen von Extrakten aus *E. coli* mit Konstrukten bekannter Sequenz des Typs ASGalT_{Chim} (24 Extrakte, inklusive des Ausgangskonstruktes ASGalT_Bib) und AS_{X+Y}GalT (20 Extrakte) analysiert. Zusätzlich wurden diese 44 Extrakte für Untersuchungen mit der HPLC-DAD (Gradient für p-Arbutin und für Kämpferol) eingesetzt (Tabelle 3.13). Als Kontrollen wurden Gesamtproteinextrakte von His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase (positiv) und von mit pET15b-transformierten *E. coli* (negativ) verwendet. Auch dieses Screening führte nicht

zur Identifizierung von Klonen mit Glykosyltransferase-Aktivität (Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13).

Tabelle 3.12: Ergebnisse des vorläufigen Screenings von Gesamtproteinextrakten in Enzymassays mit Produktnachweis über HPLC-ESI-MS/MS.

Für die verwendeten Nachweismethoden mit und ohne chromatographischer Trennung sind die sicher detektierbaren Stoffmengen angegeben.

DNA-Konstrukt	Anzahl	Produktnachweis mittels HPLC-ESI-MS/MS	
		ohne chromatographische Trennung	mit chromatographischer Trennung
AS _{X+Y} GalT	20 ¹⁾	---	negativ
ASGalT _{Chim}	3.570	negativ	---
	267	---	negativ
	24 ¹⁾	---	negativ

¹⁾ Details in Tabelle 3.13

Tabelle 3.13: Aktivitäts-Screening für ausgewählte Konstrukte mit bekannter Sequenz (siehe Abbildung 3.28, Abbildung 3.32).

Das Ergebnis des Produktnachweises ist angegeben. Die Analyse mittels HPLC-ESI-MS/MS wurde mit chromatographischer Trennung durchgeführt. n. u. = nicht untersucht

GT-Konstrukt	HPLC-DAD	HPLC-ESI-MS/MS	GT-Konstrukt	HPLC-DAD	HPLC-ESI-MS/MS
AS _{fulllength}	positiv	positiv	ASGalT _{Chim}		
GalT _{fulllength}	positiv	n. u.	1	negativ	negativ
ASGalT_Bib	negativ	negativ	2	negativ	negativ
AS_{x+y}GalT			3	negativ	negativ
AS ₂₃₅₊₁ GalT	negativ	negativ	5	negativ	negativ
AS ₂₃₅₊₂ GalT	negativ	negativ	8	negativ	negativ
AS ₂₃₆₊₁ GalT	negativ	negativ	10	negativ	negativ
AS ₂₃₆₊₂ GalT	negativ	negativ	12	negativ	negativ
AS ₂₃₆₊₃ GalT	negativ	negativ	16	negativ	negativ
AS ₂₃₇₊₂ GalT	negativ	negativ	22	negativ	negativ
AS ₂₃₇₊₃ GalT	negativ	negativ	23	negativ	negativ
AS ₂₃₇₊₄ GalT	negativ	negativ	24	negativ	negativ
AS ₂₃₈₊₃ GalT	negativ	negativ	25	negativ	negativ
AS ₂₃₈₊₄ GalT	negativ	negativ	26	negativ	negativ
AS ₂₃₈₊₅ GalT	negativ	negativ	32	negativ	negativ
AS ₂₃₉₊₄ GalT	negativ	negativ	35	negativ	negativ
AS ₂₃₉₊₅ GalT	negativ	negativ	38	negativ	negativ
AS ₂₃₉₊₆ GalT	negativ	negativ	39	negativ	negativ
AS ₂₄₀₊₅ GalT	negativ	negativ	41	negativ	negativ
AS ₂₄₀₊₆ GalT	negativ	negativ	44	negativ	negativ
AS ₂₄₀₊₇ GalT	negativ	negativ	48	negativ	negativ
AS ₂₆₃₊₀ GalT	negativ	negativ	49	negativ	negativ
AS ₂₆₃₊₁ GalT	negativ	negativ	55	negativ	negativ
AS ₂₆₂₊₂ GalT	negativ	negativ	57	negativ	negativ

4 DISKUSSION

4.1 Herstellung und Nachweis aktiver His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase

In der vorliegenden Arbeit sollte die N-terminale Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase mit der C-terminalen Domäne der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase fusioniert werden, um Glykosyltransferasen mit einer neuen Substratspezifität zu erhalten. Ausgangspunkt für die Entwicklung eines Nachweisverfahrens für die neuen Glykosyltransferasen waren die in der Literatur beschriebenen Protokolle für die Expression, Aufreinigung und Aktivitätsassays der Hydrochinon-Glucosyltransferase [108] und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase [112]. Die Anwendung dieser Protokolle war für beide Enzyme erfolgreich. Die Glykosyltransferasen wurden in *E. coli* exprimiert und anschließend als His₆-Fusionsproteine affinitätschromatographisch angereichert (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.3). Nach Inkubation mit den jeweiligen Substraten zeigte die HPLC-DAD-Analyse für beide Enzyme eine Produktbildung (Abbildung 3.2, Abbildung 3.4). Die Identität des Produktes wurde für die Hydrochinon-Glucosyltransferase mittels Standard eindeutig nachgewiesen. Für Kämpferol-3-*O*- β -D-Galactosid stand keine Referenzsubstanz zur Verfügung. Die Aktivität wurde sowohl in *E. coli*-Gesamtproteinextrakten als auch in Elutionsfraktionen mit angereichertem Enzym nachgewiesen (Abbildung 3.2 B und D und Abbildung 3.4 B und D).

Für die Entwicklung eines Nachweissystems für Glykosyltransferasen mit einem hohen Probendurchsatz wurden die Bedingungen so verändert, dass es abschließend möglich war, beide Enzyme unter identischen Bedingungen im Mikrolitermaßstab zu exprimieren, die Gesamtproteinextrakte unter identischen Bedingungen im Mikrolitermaßstab zu produzieren und den Enzymassay für beide Enzyme unter identischen Bedingungen durchzuführen (Abbildung 4.1). Damit wurden Arbeiten von Hefner et al. [108] und Miller et al. [112] bestätigt, die gezeigt hatten, dass die His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und die His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase variierte Reaktionsbedingungen tolerieren.

Mit der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase standen somit geeignete Kontrollen für die Untersuchung der verschiedenen Nachweismethoden von Glykosyltransferasen zur Verfügung. Die entwickelten Bedingungen für die Expression, den Zellaufschluss und den Enzymassay bildeten den Ausgangspunkt für das Screening chimärer Glykosyltransferasen. Dazu wurden universelle und produktspezifische Nachweisverfahren getestet.

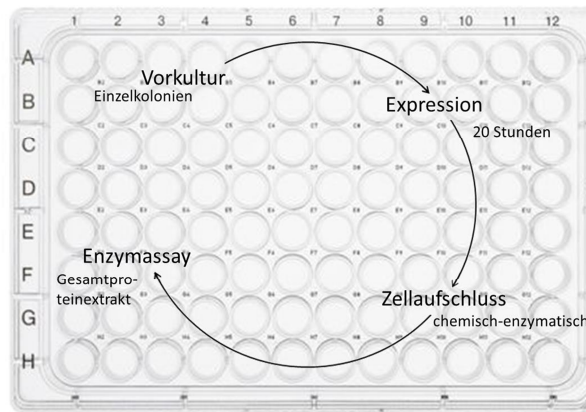


Abbildung 4.1: Analyse von Glykosyltransferasen im Mikrolitermaßstab.

Am Beispiel der His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase und der His₆-Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase wurde gezeigt, dass gemeinsame Bedingungen für die Kultivierung und Expression aktiver Glykosyltransferasen etabliert werden können. Darüber hinaus ist es gelungen, die Herstellung des Gesamtproteinextrakts und die Durchführung des Enzymassays im Mikrolitermaßstab erfolgreich umzusetzen (Kapitel 3.3).

4.2 Entwicklung von Aktivitätsnachweisen für Glykosyltransferasen

4.2.1 Universelle Nachweismethoden

Mittels „One-pot fusion“-PCR und ITCHY wurde eine Vielzahl von Mutanten aus der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase generiert (Kapitel 3.5.2 und 3.5.3). Für den Aktivitätsnachweis war ein geeignetes Hochdurchsatz-Testsystem notwendig. Eine Reihe von Testsystemen für Glykosyltransferasen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Tabelle 1.5), darunter auch solche, bei denen die Aktivität aufgrund der pH-Änderung durch die Glykosylierungsreaktion mittels pH-Indikatoren nachgewiesen wird [114]. Die Nutzung von pH-Indikatoren für den Nachweis von Enzymaktivität ist bereits für Glykosyltransferasen und andere Enzyme mehrfach beschrieben [91, 115, 116, 163 – 166]. Vorteile des Nachweises einer pH-Änderung sind neben der universelle Anwendung auf alle Glykosyltransferasen die Reduzierung von kostenintensiven Chemikalien und Laborgeräten [114]. Daher wurden ausgehend von den in der Literatur beschriebenen Testsystemen für Bakterienkolonien [91] und Proteinextrakten [92, 115, 116] verschiedene Verfahren für einen Aktivitätsnachweis für Glykosyltransferasen untersucht (Abbildung 4.2).

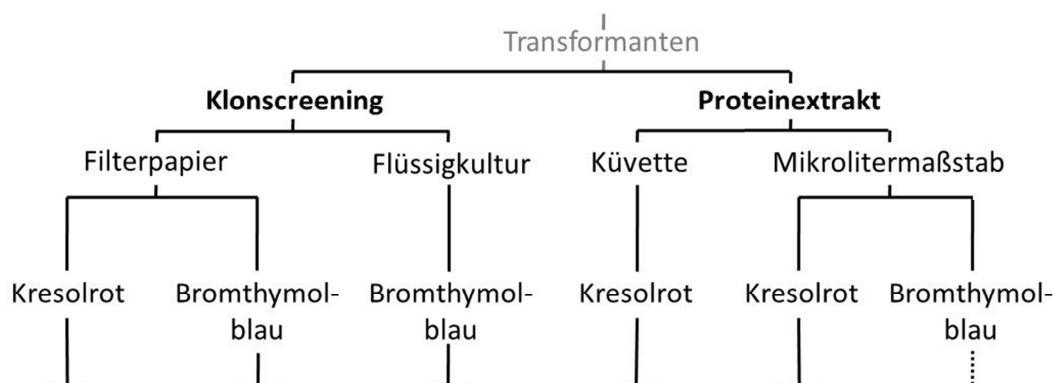


Abbildung 4.2: Identifizierung aktiver Glykosyltransferasen durch Nachweis einer pH-Änderung.

Übersicht über die untersuchten Nachweisverfahren. Das Klonscreening wurde *in vivo* in *E. coli*-Kolonien ohne eine Aufreinigung der exprimierten Glykosyltransferasen durchgeführt. Für das Screening mit Proteinextrakt wurden Expressions-, Zellaufschluss- und Assayverfahren für Gesamtproteinextrakte von *E. coli* entwickelt.

Das Klonscreening mit *E. coli*-Kolonien auf Filterpapier (Kapitel 3.4.1) bietet die Möglichkeit, die Glykosyltransferase-Aktivität direkt nach der Transformation nachzuweisen. Als ein Hochdurchsatz-System ist es eine zeitsparende und wenig aufwendige Methode, da viele Klone ohne einen Zellaufschluss und zusätzlichen Enzymassay analysiert werden können. Die mit der His₆-Hydrochinon-Glycosyltransferase durchgeführten Untersuchungen mit Kresolrot zeigen, dass damit keine Unterscheidung zwischen Kolonien mit pET15b_AS_{fulllength} und pET15b möglich ist (Abbildung 3.10). Eine visuelle Unterscheidung zwischen Kolonien mit pET15b_AS_{fulllength} und pET15b gelang erst mit der Nutzung von Bromthymolblau als pH-Indikator bei gleichzeitiger Erhöhung der Zellmasse durch Ausstreichen einzelner Kolonien (Abbildung 3.12). Die Analyse ausgewählter Kolonien ohne Bakterienausstrich (Abbildung 3.13) zeigte, dass es zu falsch positiven Zuordnungen einzelner Kolonien kommen kann. Die Anzahl untersuchter hellgrüner und dunkelgrüner Kolonien von Filterpapier ist jedoch zu gering ($n = 3$), um die Selektivität der Methode aussagekräftig bewerten zu können. Für eine genauere Validierung dieser Anwendung sollte die Stichprobenzahl an Kolonien erhöht werden.

Die Nutzung eines pH-Indikators erscheint für ein Klonscreening mit *E. coli*-Kolonien zwar prinzipiell möglich, konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit weder mit Kresolrot noch mit Bromthymolblau für ein Nachweisverfahren von Glykosyltransferase-Aktivität etabliert werden. In zwei Veröffentlichungen von Park et al. [91, 92] wurde die Verwendung von Kresolrot für die erfolgreiche Identifizierung und für kinetische Analysen von Chimären aus den Glykosyltransferasen KanF und GtfE beschrieben. In einer dieser Arbeiten wurde die erfolgreiche Übertragung des Protonennachweises mittels pH-Indikators als Klon screenings in *E. coli* auf Filterpapier gezeigt [91]. Die in dieser Veröffentlichung beschriebenen Bedingungen wurden ohne grundlegende methodische Veränderungen in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen der Hydrochinon-Glycosyltransferase verwendet. Auch nach Modifikation war eine Unterscheidung von Kolonien mit und ohne Hydrochinon-Glycosyltransferase nicht möglich. Möglicherweise wird durch die von Park et al. [91] als aktiv identifizierten Chimären im Vergleich zur Hydrochinon-Glycosyltransferase eine größere Menge an Substraten umgesetzt, sodass die resultierende Protonenfreisetzung für den Farbumschlag des pH-Indikators ausreichend ist.

Möglicherweise könnte mit einer Temperaturanpassung und durch Zugabe von Mg^{2+} ein höherer Substratumsatz erreicht werden. Das Temperaturoptimum der Hydrochinon-Glucosyltransferase liegt bei 50°C und sie wird durch 10 mM Mg^{2+} aktiviert [108]. Die Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase toleriert Temperaturen bis zu 60°C, der Einfluss von Mg^{2+} auf die Aktivität ist nicht bekannt [112]. Für die Glykosylierungsreaktion *in vivo* müssen die Substrate in ausreichender Menge von *E. coli* aufgenommen werden. Eine mögliche Erklärung für den positiven Nachweis bei Park et al. [91] könnten die verwendeten Substrate 2-Desoxystreptamin und dTDP-Glucose liefern. Möglicherweise werden diese besser von *E. coli* aufgenommen als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substrate Hydrochinon und UDP-Glucose. Weiter sind für Hydrochinon antimikrobielle Effekt bekannt. Die verwendete Konzentration von Hydrochinon in der Nachweisreaktion (220,22 µg/ml) liegt aber unterhalb der IC_{50} (1196 µg/ml, [167]), sodass ein negativer Einfluss auf die Proteinexpression und das Wachstum von *E. coli* unwahrscheinlich ist.

In Anlehnung an Differentialnährmedien, bei denen pH-Indikatoren eingesetzt werden [168 – 171], wurde versucht ein Klonscreening in Flüssigkulturen mit Bromthymolblau (Kapitel 3.4.2) für den Nachweis von Glykosyltransferase-Aktivität anzuwenden. Die Umsetzung eines solchen Screeningsystems blieb auch mit variierten Testbedingungen erfolglos und wurde daher nicht weiter verfolgt.

Alternativ wurde versucht, die pH-Änderung in Enzymassays mit Proteinextrakt mit Bromthymolblau im Mikrolitermaßstab nachzuweisen (Kapitel 3.4.3). Die Untersuchungen von Elutionsfraktionen und Gesamtproteinextrakt mit His₆-Hydrochinon-Glucosyltransferase zeigten, dass ein Nachweisverfahren mit pH-Indikatoren prinzipiell im Hochdurchsatz in Mikroplatten anwendbar ist. Der Einsatz von Bromthymolblau lieferte bei Verwendung der Wildtyp-Enzyme verlässliche Ergebnisse (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18). Bei der Anwendung zum Screening chimärer His₆-ASGalT_{Chim}-Glykosyltransferasen zeigte die nachfolgende Analyse der Reaktionsansätze mittels HPLC-DAD, dass es zu falsch positiven, jedoch nicht zu falsch negativen Zuordnungen kam. Eine Anpassung der gewählten experimentellen Bedingungen scheint daher notwendig, um die Präzision des Screenings zu erhöhen.

Deng und Chen [115] postulierten anhand von Aktivitätstests mit rekombinanten Galactosyltransferasen, dass sich der Gebrauch von pH-Indikatoren generell auf Glykosyltransferasen übertragen lässt. Die Aktivität der Galactosyltransferasen LgtB aus *Neisseria meningitidis* und HP0826 aus *Helicobacter pylori* war nach Expression in *E. coli* in Gesamtproteinex-

trakten mit Hilfe von Phenolrot photometrisch nachweisbar. Persson und Palcic [116] nutzten ein Nachweisverfahren mit Bromthymolblau im Mikrolitermaßstab, um α -(1 \rightarrow 3)-Galactosyltransferase-Aktivität in *E. coli*-Gesamtproteinextrakten nachzuweisen. Dies führte zur Identifizierung von zwei Mutanten (M214S und M214G), welche einen erhöhten Substratumsatz im Vergleich zum Wildtyp GTB aufwiesen. Daher kamen auch Persson und Palcic zu dem Schluss, dass ein Nachweis der Protonenfreisetzung bei der Glykosylierungsreaktion als universelles Nachweisverfahren für Glykosyltransferasen einsetzbar ist. Park et al. [92] nutzen den Protonennachweis mit Kresolrot zur Charakterisierung einer gereinigten chimären Glykosyltransferase im Mikrolitermaßstab. Die Absorptionsänderung wurde in einem Mikroplatten-Photometer bestimmt. Da die Indikator-basierten Nachweisverfahren für Glykosyltransferasen in den genannten Arbeiten unproblematisch erscheinen, waren die im Rahmen der vorliegenden Arbeit auftretenden Probleme überraschend, zumal mit ähnlichen Reaktionsbedingungen gearbeitet wurde (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Verwendete Bedingungen für den Nachweis der Protonenfreisetzung im Mikrolitermaßstab.

	vorliegende Arbeit	Persson und Palcic [116]
Extraktionspuffer	50 mM HEPES pH 7,5	10 mM MOPS ¹⁾ pH 7,3
Gesamtproteinextrakt	2 - 8 μ l	2 μ l
Assay-Volumen	100 μ l	100 μ l
Zuckerakzeptor	2 mM	0,5 mM
Zuckerdonor	2 mM	0,5 mM
Indikator	0,11 mM Bromthymolblau	0,11 mM Bromthymolblau
Assay-Puffer	2 mM Tris pH 7,0	1,0 mM / 2,5 mM MOPS ¹⁾ pH 7,3

¹⁾ MOPS, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure.

Nach [115] und [116] sind Art und Konzentration des Indikators wichtig für den erfolgreichen Nachweis der pH-Änderung. Der pH-Indikator muss so gewählt werden, dass sein Umschlagsbereich das pH-Optimum der zu untersuchenden Glykosyltransferase abdeckt [115]. Die Konzentration des pH-Indikators muss eine ausreichend hohe Absorption für die Messung gewährleisten, darf aber die freigesetzten Protonen nicht puffern [116]. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Indikatoren und Konzentrationen sowie die Verhältnisse der Substratkonzentrationen sind den in [115] und [116] verwendeten ähnlich. Die Substrate wurden in der Regel äquimolar eingesetzt. Ein von Deng und Chen [115] verwendeter Überschuss an Zuckerakzeptor wurde in den eigenen Nachweisreaktionen mit Gesamtproteinextrakt nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch - anders als in [115] und

[116] - für Extraktion und Assay verschiedene Puffer eingesetzt. Je nach eingesetztem Volumen könnte der Extrakt einen Einfluss auf die Pufferkapazität des Reaktionsansatzes gehabt haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Annahme über die universelle Anwendbarkeit der pH-basierten Aktivitätsmessungen [91, 115, 116] in der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigt wurde. Zwar ließ sich die Aktivität in Gesamtproteinextrakten unter Verwendung von Bromthymolblau in Mikroplatten photometrisch nachweisen, als Screeningverfahren war die Methode jedoch wegen eines zu hohen Anteils falsch-positiver Ergebnisse ungeeignet. Unabhängig von der Art der Umsetzung des Protonennachweises mittels pH-Indikators erwies sich der Vergleich mit den Kontrollen gegen den mit Expressionsvektor transformierten Expressionsstamm als zwingend erforderlich. Dies unterstreicht die Aussagen von Wagner und Pesnot [114], die die grundlegende Problematik der Arbeiten zur Entwicklung einer universellen Nachweismethode für Glykosyltransferasen folgendermaßen beschreiben: *„As with all biological assays, precision, accuracy, reproducibility and operational simplicity are important criteria during Glycosyltransferase-assay development. In addition, assay sensitivity, general applicability and adaptability for high-throughput-screening are of particular importance in the case of Glycosyltransferase assays.“*

4.2.2 Glykosidnachweis mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS

Gegenüber dem Nachweis der bei der Glykosylierung freigesetzten Protonen (Kapitel 4.2.1) ist der Nachweis des glykosylierten Produktes allgemein spezifischer und (in Abhängigkeit von der analytischen Methode) empfindlicher. Der Glykosidnachweis muss jeweils separat etabliert werden und kann durch die Verfügbarkeit von Referenzsubstanzen limitiert sein. In der vorliegenden Arbeit sollten die Methoden nur für den qualitativen Nachweis chimärer Glykosyltransferasen verwendet werden.

Wie in Kapitel 3.1 und 3.2 gezeigt, kann die Aktivität heterolog exprimierter His₆-Hydrochinon-Glycosyltransferase und His₆-Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase über den Glykosidnachweis mittels HPLC-DAD detektiert werden. Das Screening nach chimären Glykosyltransferasen (Kapitel 3.6), war jedoch nicht erfolgreich (Tabelle 3.13). Möglicherweise besitzen die untersuchten chimären Enzyme keine oder nur eine geringe Aktivität, sodass die Menge des gebildeten Glykosids unter der Nachweisgrenze (2,3 pmol für p-Arbutin) lag. Als Alternative wurde aufgrund der höheren Sensitivität die HPLC-ESI-MS/MS zum Nachweis von Hydrochinon-Glykosiden verwendet (Kapitel 3.6). Für das Hydrochinon-Galactosid als Pro-

dukt der hergestellten chimären Glykosyltransferasen wurde eine mit p-Arbutin übereinstimmende ESI-Fragmentierung angenommen, da sich Galactose und Glucose aufgrund der Stereoisomerie nicht in ihrer Masse unterscheiden [172, 173]. p-Arbutin-Standard ließ sich in einer Menge von 0,5 pmol mit und 0,1 pmol ohne chromatographische Trennung nachweisen.

Im Zuge des Screenings ergaben sich Hinweise auf einen Matrixeffekt. Wenn ohne chromatographische Trennung gearbeitet wurde, konnten 100 pmol p-Arbutin in Gegenwart der Extraktbestandteile nicht nachgewiesen werden, während 0,1 pmol Standard detektierbar war. Der Matrixeffekt muss genauer untersucht werden, wenn Proben ohne chromatographische Trennung untersucht werden sollen. Aber auch für die Analyse mit chromatographischer Trennung sollten Matrixeffekte überprüft werden.

Um die Anzahl der HPLC-ESI-MS/MS-Läufe im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings zu reduzieren wurde getestet, ob der Nachweis auch möglich ist, wenn Enzymassays mit einer Mischung von drei Gesamtproteinextrakten durchgeführt werden. Bei Mischung eines aktiven (His₆-Hydrochinon-Glycosyltransferase) mit zwei inaktiven Extrakten, war p-Arbutin ohne chromatographische Trennung detektierbar. Da die Methode mit chromatographischer Trennung Matrixeffekte minimiert, ist davon auszugehen, dass die Mischung von drei Gesamtproteinextrakten im Enzymassay möglich ist. Dies wurde jedoch noch nicht getestet und müsste für eine vollständige Methodenvalidierung ergänzt werden.

Im Vergleich zu den universellen Nachweismethoden und der HPLC-DAD erscheint die HPLC-ESI-MS/MS mit chromatographischer Trennung trotz aufwendiger Vorbereitung des Gesamtproteinextraktes und der Durchführung des Enzymassays als das geeignetste zur Verfügung stehende System für die Identifizierung chimärer Glykosyltransferasen. Die ohne chromatographische Trennung durchgeführte Analyse von 3.570 Klonen mit chimären Konstrukten ist aufgrund der auftretenden Matrixeffekte nur schwer zu bewerten. Es kann jedoch festgehalten werden, dass unter den untersuchten chimären Konstrukten keine Enzyme mit einer vergleichbaren oder höheren Aktivität im Vergleich zur His₆-Hydrochinon-Glycosyltransferase vorlagen. Weiter ist aufgrund des methodischen Vorgehens zur Erzeugung der chimären Konstrukte zu berücksichtigen, dass nur etwa ein Drittel der untersuchten Konstrukte einen ORF besitzen. In den Proben der 310 Klone, die mit chromatographischer Trennung untersucht wurden (Tabelle 3.13), wurde kein Hydrochinon-Galactosid nachgewiesen. Nach Ermittlung der Wiederfindungsrate und abschließender Validierung der HPLC-ESI-

MS/MS-Methode mit chromatographischer Trennung muss in zukünftigen Untersuchungen ein hoher Probendurchsatz erreicht werden, um die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung einer aktiven chimären Glykosyltransferase zu maximieren.

4.3 Konstruktion chimärer Glykosyltransferasen mit Domänen der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase

Für das rationale Design von chimären Glykosyltransferasen des Typs $AS_{x+y}GalT$ (Kapitel 3.5.2) wurde die OE-PCR erfolgreich zur „One-pot fusion“-PCR vereinfacht (Kapitel 3.5.1, [143]). Die „One-pot fusion“-PCR ist uneingeschränkt zur Erzeugung hybrider Gene einsetzbar. Im Vergleich zu dem erwarteten Produkt werden in sehr geringer Menge unspezifische DNA-Fragmente gebildet (Abbildung 3.27). Da das erwartete DNA-Fragment vor der Umklonierung in einen Expressionsvektor aus dem Agarosegel extrahiert wird, können die unspezifischen Produkte anderer Größe vernachlässigt werden. Für die Bereitstellung eines umfangreichen „molekularen Werkzeugkastens“ zur Herstellung funktionell angepasster Glykosyltransferasen, bei denen Zuckerakzeptor- und Zuckerdonor-Domänen frei miteinander kombiniert werden können, ist die „One-pot fusion“-PCR wegen der limitierten Probenzahl nur bedingt nutzbar. Jedoch stellt sie eine effektive Methode dar, um im Rahmen der gerichteten Evolution eine Auswahl chimärer Gene mit geringem experimentellen und finanziellen Aufwand zu erzeugen [143].

Mit Vorhersagen der Sekundärstrukturen, Sequenzvergleichen und Vergleichen mit experimentell ermittelten Strukturen von Glykosyltransferasen wurden zunächst Domänengrenzen der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase definiert (Tabelle 4.2, persönliche Mitteilung Dr. L. Barleben).

Tabelle 4.2: Angenommene Domänengrenzen der verwendeten Glykosyltransferasen.

Glykosyltransferase	N-terminal	Linker-Region (α -Helix)	C-terminal
Hydrochinon-Glucosyltransferase	1-235	236-263 (254-258)	264-470
Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase	1-237	238-268 (256-261)	269-452

Für die chimären Glykosyltransferasen $AS_{235+1}GalT$ und $AS_{263+0}GalT$ (Abbildung 3.28) wurde die Zuckerakzeptor-Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase und die Zuckerdonor-Domäne der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase mit einem der ursprünglichen Linkerpeptide fusioniert. Der Fusionspunkt wurde im Weiteren ausgehend von $AS_{235+1}GalT$ immer um eine Aminosäure in Richtung C-Terminus verschoben. Damit entstanden chimäre Glykosyltransferasen mit einem zunehmenden Anteil Hydrochinon-Glucosyltransferase-Linker (Position 235-240) und einem abnehmenden Anteil Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase-Linker

(Position 238-243) (Abbildung 3.28). Die 20 resultierenden chimären Enzyme des Typs $AS_{X+Y}GalT$ wiesen mit 449 bis 451 Aminosäuren eine ähnliche Größe wie die Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (452 Aminosäuren) auf, waren also 20 Aminosäuren kürzer als die Hydrochinon-Glucosyltransferase. Mit dem zur Verfügung stehenden Screening konnte für keine der $AS_{X+Y}GalT$ -Chimären Glykosyltransferaseaktivität nachgewiesen werden (Tabelle 3.13). Eine Verschiebung des Fusionspunktes in analoger Weise auf Seite der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase wurde ausgehend von dem Konstrukt $AS_{263+0}GalT$ nicht durchgeführt. Solche Konstrukte könnten in zukünftigen Arbeiten ergänzt werden.

Truman et al. und Kim et al. [87, 93] fusionierten Domänen von Glykosyltransferasen mit hoher Identität der Primärstruktur (66 % - 93 %) (Tabelle 1.4). Der Fusionspunkt der GtfB-Chimären von Truman et al. [87] lag mit Position Gln206 innerhalb der N-terminalen Domäne in einer Region (Aminosäuren 206 - 226), in der die parentalen Enzyme GtfB und Orf10* eine Sequenzidentität von 90,5 % aufweisen. Für GtfB und Orf10* besteht das Linkerpeptid aus den Aminosäuren 219 - 235. Bei Kim et al. [93] wurde das Linkerpeptid mit den Aminosäuren 160 - 185 beschrieben und der Fusionspunkt lag zwischen den Aminosäuren E200 und K201 innerhalb der C-terminalen Domäne. In beiden Arbeiten wurde also nicht die Linker-Region für die Fusion verwendet sondern eine Region mit hoher Aminosäuresequenz-Identität, in der Nähe des Linkers. Hansen et al. [88] kombinierten Domänen von Glykosyltransferasen mit geringer Aminosäuresequenz-Identität (21 - 22 %) zu aktiven chimären Enzymen (Tabelle 1.4). Die Fusionspunkte lagen innerhalb der N-terminalen Domäne oder in der Linker-Region. Fusionspunkte in der Linker-Region wurden auch von Park et al. [92] beschrieben. Prinzipiell erscheint also die Fusion in der Linker-Region oder in den flankierenden Bereichen möglich. Es gibt bisher jedoch keine allgemein anwendbare Strategie zur Identifizierung eines geeignet Fusionspunktes. Strukturelle Änderungen in der Linker-Region können sich sehr stark auf die Faltung der Domänen auswirken. Im Falle der Fusion von GtfE und KanF führte die Verwendung des kurzen Linkerpeptids von GtfE zu einem Verlust des aktiven Zentrums und zu einer falsch gefalteten Zuckerakzeptor-Domäne [92]. Die Fusion unter Erhalt beider Linkerpeptide führte zu einem Verlust der Rossmann-artigen Faltung im N-Terminus [92].

Die in dieser Arbeit für eine Domänenfusion gewählten Glykosyltransferasen Hydrochinon-Glucosyltransferase und Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase haben eine Aminosäuresequenz-Identität von 26,7 % (Clustal Omega; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>,

[174]). Nach den Ergebnissen von Hansen et al. [88] erscheint es trotz einer geringen Identität zwischen parentalen Glykosyltransferasen möglich aktive Chimäre zu erzeugen. In der vorliegenden Arbeit gelang dies jedoch nicht. Zukünftigen Untersuchungen sollten molekulare Modellierungen vorausgehen, um Anhaltspunkte für ein rationales Design der Linker-Region in Chimären des Typs $AS_{x+y}GalT$ zu erhalten. Versuche zur schrittweisen Verkürzung der Peptide der parentalen Glykosyltransferasen könnten die Ergebnisse von Modellierungen ergänzen und Anhaltspunkte zu essentiellen Bereichen der Linker-Region liefern. Zudem könnten die bereits hergestellten Konstrukte (Abbildung 3.28) um solche erweitert werden, bei denen der Fusionspunkt innerhalb der flankierenden Glykosyltransferase-Domänen [87] liegt.

Die von Ostermeier et al. beschriebene Technik zur Kombination von Genfragmenten (ITL, [100]) bietet die Möglichkeit zur Erzeugung einer Bibliothek chimärer Proteine mit jedem theoretisch denkbaren Fusionspunkt. Der Nutzen dieser Methode erstreckt sich über die Identifikation für die Funktionalität eines Proteins essentieller Domänen und Motive, bis zur Anwendung für den Domänen austausch zwischen Proteinen. Damit ist sie ein wichtiges Werkzeug für das künstliche Proteindesign und wird in der gerichteten Evolution eingesetzt. Die daraus hervorgegangene ITCHY-Technik [96] wurde zur Herstellung von chimären Glykosyltransferasen des Typs $ASGalT_{Chim}$ verwendet (Kapitel 3.5.3). Durch diese Technik kann das Repertoire an chimären Genen um ein Vielfaches erweitert werden. Dabei werden die Fusionspunkte zufällig erzeugt, indem Exonuklease III unterschiedlich lange auf die zu kombinierenden Enden einer linearen DNA einwirkt. Die Gesamtheit der möglichen Kombinationen bei Anwendung der ITCHY-Technik auf die DNA-Fragmente für die Hydrochinon-Glycosyltransferase (789 bp) und die Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase (804 bp) im Plasmid pET15b_ $ASGalT_{Bib}$ liegt bei 634.356. Die Kombinationsmöglichkeiten nur aus der Linker-Region der Hydrochinon-Glycosyltransferase (84 bp) und der Kämpferol-3-O-Galactosyltransferase (93 bp) beträgt 7.812. Die in Vorversuchen ermittelte maximale Inkubationsdauer mit Exonuklease III von zehn Minuten sollte den Abbau der Linker-Region auf etwa die Länge des nativen Linkers (entsprechend circa 30 - 35 Aminosäuren) ohne einen Abbau der Zuckerakzeptor- bzw. Zuckerdonor-Domäne-kodierenden DNA ermöglichen. Das Ergebnis von 58 exemplarisch sequenzierten chimären $ASGalT_{Chim}$ -Genen zeigte, dass nur circa 7 % der erzeugten Linker-Regionen die erwartete Größe und 93 % eine größere Linker-Region (100 - 177 bp) aufwiesen (Tabelle 3.10). Bei der Fusion von *kanF* und *gtfE* [91] entsprach die Größe

der funktionalen Gene etwa der Summe aus beiden parentalen DNA-Fragmenten. Für Konstrukte mit einer geringeren oder größeren Basenzahl wurde keine Aktivität nachgewiesen. Somit könnten für die Fusion der Hydrochinon-Glucosyltransferase und der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase in der vorliegenden Arbeit weitere Anpassungen bezüglich der Inkubationsdauer bzw. der Exonuklease III-Aktivität [175] und des Probenentnahmeintervalls bei der ITCHY-Technik zur Erzeugung von *ASGalT_{Chim}*-Genen notwendig sein.

Innerhalb der untersuchten Stichprobe wurde insgesamt eine heterogene Zusammensetzung der Linker-Region beobachtet (Abbildung 3.30). Erwartungsgemäß hatte nur circa $\frac{1}{3}$ der Gene einen ORF. Die Betrachtung der 23 chimären Gene mit ORF (Abbildung 3.32) zeigt, dass es bei etwa 9 % der Gene zu Mutationen gekommen ist, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben. Bei 22 % der chimären Proteine fehlte die Region der α -Helix im Linkerpeptid der Hydrochinon-Glucosyltransferase (Abbildung 3.32). Die α -Helix im Linkerpeptid der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase blieb bei allen untersuchten chimären Enzymen erhalten. Der Einfluss dieser Veränderungen auf die Aktivität konnte in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Wegen des geringen Anteils von Konstrukten mit ORF und der Vielzahl theoretisch möglicher Fusionspunkte ist ein Hochdurchsatz-Nachweisverfahren für weiterführende Untersuchungen zwingend erforderlich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen, dass für die Etablierung eines molekularen Werkzeugkastens für die Modifikation von Glykosyltransferasen zu gezielter Glykosylierung variabler Substrate zwei Herausforderungen zu bewältigen sind. Erstens muss eine ausreichende Anzahl von unterschiedlich fusionierten Glykosyltransferase-Konstrukten bereitgestellt werden. Zweitens muss sich ein Hochdurchsatz-Screening anschließen, um aktive Chimäre zu identifizieren. Im Rahmen der Arbeit zeigte sich das große Potenzial der ITCHY-Technik zur Erzeugung von *ASGalT_{Chim}*-Glykosyltransferasen. Zur Erzeugung einer Linker-Region mit überwiegend 28 - 31 Aminosäuren, entsprechend der parentalen Glykosyltransferasen, müssen sowohl die Inkubationsdauer als auch das Intervall der Probenentnahme optimiert werden. Zudem wurde ein erstes Hochdurchsatz-Screening mit chimären Konstrukten mittels HPLC-ESI-MS/MS durchgeführt. Eine chromatographische Trennung erwies sich für die Analyse von Reaktionsansätzen als zwingend notwendig und könnte in zukünftigen Arbeiten für den Hochdurchsatz optimiert werden. Weitere Untersuchungen und Anpassungen müssen für die Analyse von heterogenen Mischungen zur Erhöhung des Proben-

durchsatzes im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings erfolgen. Ergänzend muss die Wiederfindungsrate des Analyten im Reaktionsansatz mit Vektorkontrolle einerseits für die Validierung der Methode, andererseits für die Quantifizierung der Aktivität chimärer Konstrukte bestimmt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Glykosyltransferasen katalysieren die Kondensation zwischen einem Zucker und einem weiteren Zuckermolekül oder einem Aglykon. Die Enzyme der Superfamilie GT-A und GT-B besitzen zwei Domänen, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind. Zwischen den beiden Domänen befindet sich das aktive Zentrum. Während die eine Domäne den Zuckerdonor in Form eines aktivierten Zuckers bindet, wird der Zuckerakzeptor von der zweiten Domäne gebunden. Die Substratspezifität der Domänen kann hoch oder gering sein. Aufgrund der Zwei-Domänen-Struktur ergibt sich die Möglichkeit die Domänen verschiedener Glykosyltransferasen miteinander zu kombinieren, um beliebige Aglyka gezielt mit unterschiedlichen Zuckern kondensieren zu können. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Kombination der Zuckerakzeptor-Domäne der Hydrochinon-Glucosyltransferase mit geringer Substratspezifität und der Zuckerdonor-Domäne der Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase mit hoher Substratspezifität. Wegen der großen Anzahl möglicher Fusionspunkte sollte eine Gen-Bibliothek für chimäre Glykosyltransferasen erstellt werden. Für den Aktivitätsnachweis chimärer Glykosyltransferasen sollte ein Hochdurchsatz-System etabliert werden.

Für die Herstellung einer Gen-Bibliothek für chimäre Glykosyltransferasen mit einem definierten Fusionspunkt innerhalb der Linker-Region wurde die „*overlap extension*“-PCR zur zeit- und kostensparenden „*One-pot fusion*“-PCR weiterentwickelt. Die Methode „*incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*“ (ITCHY) wurde verwendet, um eine Bibliothek chimärer Gene mit einem zufälligen Fusionspunkt innerhalb der Linker-Region zu generieren. Die Expression aller Konstrukte wurde in *E. coli* durchgeführt.

Zunächst wurde der Aktivitätsnachweis der heterolog exprimierten Ausgangsenzyme, Hydrochinon-Glucosyltransferase und Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase, geführt, indem die in Enzymreaktionen gebildeten Glykoside mittels HPLC-DAD nachgewiesen wurden. Die Reaktionsbedingungen wurden dann vereinheitlicht und es wurde gezeigt, dass beide Enzyme unter identischen Reaktionsbedingungen analysiert werden können. Für den Aktivitätsnachweis im Hochdurchsatz wurde zunächst die Änderung des pH-Wertes durch das bei der Glykosylierungsreaktion freigesetzte Proton mit einem Indikator verfolgt. Dabei wurden Verfahren zum Kolonie-Screening und Enzymreaktionen mit Gesamtproteinextrakten im Mikrolitermaßstab untersucht. Keines dieser Verfahren erwies sich für den Hochdurchsatz als verlässlich genug. Daher wurde für die Hydrochinon-Glucosyltransferase eine HPLC-ESI-MS/MS-Methode zum Nachweis des Produktes p-Arbutin erarbeitet, welches auf die Unter-

suchung der Extrakte von *E. coli* mit chimären Konstrukten übertragen wurde. Der Proben-durchsatz wurde erhöht, indem der Enzymassay in Mikroplatten mit Mischproben aus drei Gesamtproteinextrakten durchgeführt wurde. Die Identifizierung einer aktiven chimären Glykosyltransferase gelang nicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ICHTY-Technik eine zeitsparende Methode zur Erzeugung einer Gen-Bibliothek für chimäre Glykosyltransferasen darstellt. Für das Ziel eine aktive Chimäre zu erzeugen, muss die Methode allerdings so optimiert werden, dass mehr chimäre Konstrukte entstehen, deren Linker-Region eine ähnliche Größe besitzt wie die Linker-Regionen der Ausgangsgene. Der pH-basierte Aktivitätsnachweis ist zwar prinzipiell im Hochdurchsatz möglich, die Treffsicherheit der Methode ist jedoch gering. Die in der Literatur postulierte Übertragbarkeit bestehender Protokolle auf beliebige Glykosyltransferasen erscheint daher zweifelhaft. Der spezifische Produktnachweis mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS zeichnet sich durch hohe Empfindlichkeit und Treffsicherheit aus. Bei dem massenspektrometrischen Nachweis stellte sich heraus, dass eine chromatographische Trennung für die Analyse von Reaktionen mit Gesamtproteinextrakten wegen eines Matrixeffektes unerlässlich ist. Der hohen Empfindlichkeit und Treffsicherheit steht daher ein relativ großer experimenteller und zeitlicher Aufwand gegenüber. Trotzdem erscheint die HPLC-ESI-MS/MS auf der Basis der vorliegenden Untersuchungen die Methode der Wahl für die Aktivitätsbestimmung im Hochdurchsatz zu sein.

ABSTRACT

Glycosyltransferases catalyze the condensation between a sugar and another sugar molecule or an aglycone. Enzymes of the superfamilies GT-A and GT-B possess two domains which are connected by a linker-region. The active site is located between the two domains. One domain binds the sugar donor, which is an activated sugar, whereas the other domain binds the sugar acceptor. Substrate specificity of the domains can be high or low. Combination of the domains of different glycosyltransferases, i.e. domain swapping, opens the possibility for targeted glycosylation from an aglycone of choice and any sugar. This study was aimed at combining the sugar acceptor-domain of hydroquinone-glucosyltransferase with low substrate specificity with the sugar donor-domain of kaempferol-3-*O*-galactosyltransferase with high substrate specificity. Because of the high number of possible fusion sites a gene library for chimeric glycosyltransferases had to be generated. To identify active chimeric glycosyltransferases a high-throughput screening had to be established.

In order to obtain a gene library for chimeric glycosyltransferases with a defined fusion site within the linker-region, the “*overlap extension*”-PCR was developed into the time- and cost-saving “*One-pot fusion*”-PCR. For the generation of a library of chimeric genes with random fusion sites, the “*incremental truncation for the creation of hybrid enzymes*” (ITCHY) was applied. All constructs were expressed in *E. coli*.

Enzyme activity was first shown for the heterologously expressed wildtype enzymes, hydroquinone-glucosyltransferase and kaempferol-3-*O*-galactosyltransferase, by HPLC-DAD detection of glycosides produced in enzyme assays. Reaction conditions were then unified and it was demonstrated that both enzymes can be analyzed with identical reaction conditions. For high-throughput activity screening, proton release during glycosylation was monitored by means of a pH- indicator. This principle was applied to colony screening and enzyme assays with crude protein extract in 96-well plates. However, the method was not reliable enough to be used in a high-throughput screening. Therefore, an HPLC-ESI-MS/MS method was established for the detection of the hydroquinone-glucosyltransferase product p-arbutin. This method was applied to screen crude extracts of *E. coli* containing chimeric constructs. To increase sample throughput, mixtures of three crude extracts were analyzed in enzyme assays in 96-well plates. However, no active chimeric glycosyltransferase was identified.

The results of this study show that ITCHY is a time-saving method to create a gene library for chimeric glycosyltransferases. In order to obtain an active chimera, this method has to be improved to obtain more chimeras with a linker-region of similar length as found in the parental glycosyltransferases. Although the pH-based assay seemed to be principally applicable, the number of false-positive results was too high for use in high-throughput screening. Thus, the general applicability of pH-based screening protocols to all glycosyltransferases that has been claimed in the literature has to be regarded with skepticism. Glycoside detection by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS is characterized by high sensitivity and correct assignment of samples with active enzyme. Mass spectrometric detection should not be applied without prior chromatographic separation because of matrix effects. As a disadvantage, screening by product identification by HPLC-ESI-MS/MS is rather time consuming and requires a lot of experimentation. Nevertheless, HPLC-ESI-MS/MS appears to be the most suitable method for high-throughput screening to identify active chimeric glycosyltransferases based on this study.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Wiederschain, G. Y. (2013) Glycobiology: progress, problems, and perspectives. *Biochem. Biokhimiya* **78**, 679–696.
- 2 Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. and Etzler, M. E. (Eds.). (2009) *Essentials of Glycobiology* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- 3 Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.-K. and Poppenberger, B. (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 254–263.
- 4 Erb, A., Weiss, H., Härle, J. and Bechthold, A. (2009) A bacterial glycosyltransferase gene toolbox: generation and applications. *Phytochemistry* **70**, 1812–1821.
- 5 Jones, P. and Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**, 164–174.
- 6 Ha, S., Walker, D., Shi, Y. and Walker, S. (2000) The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **9**, 1045–1052.
- 7 Ikeda, M., Wachi, M., Jung, H. K., Ishino, F. and Matsushashi, M. (1991) The *Escherichia coli mraY* gene encoding UDP-N-acetylmuramoyl-pentapeptide: undecaprenyl-phosphate phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase. *J. Bacteriol.* **173**, 1021–1026.
- 8 Albesa-Jové, D., Giganti, D., Jackson, M., Alzari, P. M. and Guerin, M. E. (2014) Structure-function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. *Glycobiology* **24**, 108–124.
- 9 Lao, J., Oikawa, A., Bromley, J. R., McInerney, P., Suttangkakul, A., Smith-Moritz, A. M., Plahar, H., Chiu, T.-Y., González Fernández-Niño, S. M., Ebert, B., et al. (2014) The plant glycosyltransferase clone collection for functional genomics. *Plant J.* **79**, 517–529.
- 10 Spiro, R. G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R–56R.
- 11 Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J. and Withers, S. G. (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 521–555.
- 12 Hu, Y. and Walker, S. (2002) Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem. Biol.* **9**, 1287–1296.
- 13 Zhang, C., Griffith, B. R., Fu, Q., Albermann, C., Fu, X., Lee, I.-K., Li, L. and Thorson, J. S. (2006) Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions. *Science* **313**, 1291–1294.
- 14 Zhang, C., Fu, Q., Albermann, C., Li, L. and Thorson, J. S. (2007) The *in vitro* characterization of the erythronolide mycarosyltransferase EryBV and its utility in macrolide diversification. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **8**, 385–390.
- 15 Luzhetskyy, A., Fedoryshyn, M., Dürr, C., Taguchi, T., Novikov, V. and Bechthold, A. (2005) Iteratively acting glycosyltransferases involved in the hexasaccharide biosynthesis of landomycin A. *Chem. Biol.* **12**, 725–729.

- 16 Lu, W., Leimkuhler, C., Oberthür, M., Kahne, D. and Walsh, C. T. (2004) AklK is an L-2-deoxyfucosyltransferase in the biosynthesis of the anthracycline aclacinomycin A. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 4548–4558.
- 17 Schuman, B., Alfaro, J. A. and Evans, S. V. (2007) Glycosyltransferase structure and function. In *Bioactive Conformation I* (Peters, T., ed.), pp 217–257, Springer Berlin Heidelberg.
- 18 Vogt, T. and Jones, P. (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* **5**, 380–386.
- 19 Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, D490–495.
- 20 Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V. and Henrissat, B. (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326 (Pt 3)**, 929–939.
- 21 Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J. and Henrissat, B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307–317.
- 22 Breton, C., Šnajdrová, L., Jeanneau, C., Koča, J. and Imberty, A. (2006) Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* **16**, 29R–37R.
- 23 Perez, S., Sarkar, A., Breton, C., Drouillard, S., Rivet, A. and Imberty, A. (2013) Glyco3D: A portal for structural glycoscience <http://www.glyco3d.cermav.cnrs.fr>.
- 24 Charnock, S. J. and Davies, G. J. (1999) Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 6380–6385.
- 25 Vrielink, A., Rüger, W., Driessen, H. P. and Freemont, P. S. (1994) Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *EMBO J.* **13**, 3413–3422.
- 26 Igura, M., Maita, N., Kamishikiryo, J., Yamada, M., Obita, T., Maenaka, K. and Kohda, D. (2008) Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase. *EMBO J.* **27**, 234–243.
- 27 Liu, J. and Mushegian, A. (2003) Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **12**, 1418–1431.
- 28 Rosén, M. L., Edman, M., Sjöström, M. and Wieslander, Å. (2004) Recognition of fold and sugar linkage for glycosyltransferases by multivariate sequence analysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 38683–38692.
- 29 Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Gotoh, M. and Narimatsu, H. (2003) Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 574–579.
- 30 Pedersen, L. C., Dong, J., Taniguchi, F., Kitagawa, H., Krahn, J. M., Pedersen, L. G., Sugahara, K. and Negishi, M. (2003) Crystal structure of an α 1,4-N-Acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 14420–14428.

- 31 Moréra, S., Larivière, L., Kurzeck, J., Aschke-Sonnenborn, U., Freemont, P. S., Janin, J. and Rüger, W. (2001) High resolution crystal structures of T4 phage β -glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding. *J. Mol. Biol.* **311**, 569–577.
- 32 Lizak, C., Gerber, S., Numao, S., Aebi, M. and Locher, K. P. (2011) X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase. *Nature* **474**, 350–355.
- 33 Gloster, T. M. (2014) Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **28**, 131–141.
- 34 Rini, J., Esko, J. and Varki, A. (2009) Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes. In *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., and Etzler, M. E., eds.) 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- 35 Chang, A., Singh, S., Phillips, G. N. and Thorson, J. S. (2011) Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 800–808.
- 36 Ma, B., Wang, G., Palcic, M. M., Hazes, B. and Taylor, D. E. (2003) C-terminal amino acids of *Helicobacter pylori* alpha1,3/4 fucosyltransferases determine type I and type II transfer. *J. Biol. Chem.* **278**, 21893–21900.
- 37 Qasba, P. K., Ramakrishnan, B. and Boeggeman, E. (2005) Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 53–62.
- 38 Larivière, L., Gueguen-Chaignon, V. and Moréra, S. (2003) Crystal structures of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J. Mol. Biol.* **330**, 1077–1086.
- 39 Unligil, U. M. and Rini, J. M. (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 510–517.
- 40 Wrabl, J. O. and Grishin, N. V. (2001) Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.* **314**, 365–374.
- 41 Rao, S. T. and Rossmann, M. G. (1973) Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **76**, 241–256.
- 42 Hanukoglu, I. (2015) Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **43**, 206–209.
- 43 Pedersen, L. C., Darden, T. A. and Negishi, M. (2002) Crystal structure of beta 1,3-glucuronyltransferase I in complex with active donor substrate UDP-GlcUA. *J. Biol. Chem.* **277**, 21869–21873.
- 44 Persson, K., Ly, H. D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. and Strynadka, N. C. J. (2001) Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 166–175.
- 45 Breton, C., Bettler, E., Joziase, D. H., Geremia, R. A. and Imberty, A. (1998) Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases. *J. Biochem. (Tokyo)* **123**, 1000–1009.

- 46 Qasba, P. K., Ramakrishnan, B. and Boeggeman, E. (2008) Structure and function of beta -1,4-galactosyltransferase. *Curr. Drug Targets* **9**, 292–309.
- 47 Chang, A., Singh, S., Helmich, K. E., Goff, R. D., Bingman, C. A., Thorson, J. S. and Phillips, G. N., Jr. (2011) Complete set of glycosyltransferase structures in the calicheamicin biosynthetic pathway reveals the origin of regiospecificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17649–17654.
- 48 Mulichak, A. M., Losey, H. C., Lu, W., Wawrzak, Z., Walsh, C. T. and Garavito, R. M. (2003) Structure of the TDP-epi-vancosaminyltransferase GtfA from the chloroeremomycin biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9238–9243.
- 49 Bolam, D. N., Roberts, S., Proctor, M. R., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Davis, B. G., Davies, G. J. and Gilbert, H. J. (2007) The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5336–5341.
- 50 Claesson, M., Siitonen, V., Dobritsch, D., Metsä-Ketelä, M. and Schneider, G. (2012) Crystal structure of the glycosyltransferase SnogD from the biosynthetic pathway of nogalamycin in *Streptomyces nogalater*. *FEBS J.* **279**, 3251–3263.
- 51 Rao, F. V., Rich, J. R., Rakić, B., Buddai, S., Schwartz, M. F., Johnson, K., Bowe, C., Wakarchuk, W. W., DeFrees, S., Withers, S. G., et al. (2009) Structural insight into mammalian sialyltransferases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1186–1188.
- 52 Chiu, C. P. C., Watts, A. G., Lairson, L. L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. and Strynadka, N. C. J. (2004) Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 163–170.
- 53 Yuan, Y., Barrett, D., Zhang, Y., Kahne, D., Sliz, P. and Walker, S. (2007) Crystal structure of a peptidoglycan glycosyltransferase suggests a model for processive glycan chain synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5348–5353.
- 54 Sinnott, M. L. (1990) Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1171–1202.
- 55 Murray, B. W., Takayama, S., Schultz, J. and Wong, C. H. (1996) Mechanism and specificity of human alpha-1,3-fucosyltransferase V. *Biochemistry (Mosc.)* **35**, 11183–11195.
- 56 Garinot-Schneider, C., Lellouch, A. C. and Geremia, R. A. (2000) Identification of essential amino acid residues in the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase ExoM. *J. Biol. Chem.* **275**, 31407–31413.
- 57 Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Tarling, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J. and Davies, G. J. (2006) Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.* **25**, 1396–1405.
- 58 Pak, J. E., Arnoux, P., Zhou, S., Sivarajah, P., Satkunarajah, M., Xing, X. and Rini, J. M. (2006) X-ray crystal structure of leukocyte type core 2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase. Evidence for a convergence of metal ion-independent glycosyltransferase mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**, 26693–26701.

-
- 59 Sheridan, R. P., Levy, R. M. and Salemme, F. R. (1982) α -Helix dipole model and electrostatic stabilization of 4- α -helical proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 4545–4549.
- 60 Nicholson, H., Becktel, W. J. and Matthews, B. W. (1988) Enhanced protein thermostability from designed mutations that interact with α -helix dipoles. *Nature* **336**, 651–656.
- 61 Breton, C., Fournel-Gigleux, S. and Palcic, M. M. (2012) Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 540–549.
- 62 Kapitonov, D. and Yu, R. K. (1999) Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**, 961–978.
- 63 Claus, H., Stummeyer, K., Batzilla, J., Mühlenhoff, M. and Vogel, U. (2009) Amino acid 310 determines the donor substrate specificity of serogroup W-135 and Y capsule polymerases of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **71**, 960–971.
- 64 Hughes, J. and Hughes, M. A. (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *Mitochondrial DNA* **5**, 41–49.
- 65 Tvaroška, I. (2014) Atomistic insight into the catalytic mechanism of glycosyltransferases by combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) methods. *Carbohydr. Res.*
- 66 Zechel, D. L. and Withers, S. G. (2000) Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **33**, 11–18.
- 67 Lairson, L. L. and Withers, S. G. (2004) Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 2243–2248.
- 68 Monegal, A. and Planas, A. (2006) Chemical rescue of α 3-galactosyltransferase. Implications in the mechanism of retaining glycosyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16030–16031.
- 69 Soya, N., Fang, Y., Palcic, M. M. and Klassen, J. S. (2011) Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases. *Glycobiology* **21**, 547–552.
- 70 Davies, G. J. (2001) Sweet secrets of synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **8**, 98–100.
- 71 Gómez, H., Polyak, I., Thiel, W., Lluch, J. M. and Masgrau, L. (2012) Retaining glycosyltransferase mechanism studied by QM/MM methods: lipopolysaccharyl- α -1,4-galactosyltransferase C transfers α -galactose via an oxocarbenium ion-like transition state. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4743–4752.
- 72 Lee, S. S., Hong, S. Y., Errey, J. C., Izumi, A., Davies, G. J. and Davis, B. G. (2011) Mechanistic evidence for a front-side, S_Ni -type reaction in a retaining glycosyltransferase. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 631–638.
- 73 Härle, J. and Bechthold, A. (2009) Chapter 12. The power of glycosyltransferases to generate bioactive natural compounds. *Methods Enzymol.* **458**, 309–333.
- 74 Tobin, M. B., Gustafsson, C. and Huisman, G. W. (2000) Directed evolution: the “rational” basis for “irrational” design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 421–427.
-

- 75 Kuchner, O. and Arnold, F. H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* **15**, 523–530.
- 76 Stemmer, W. P. (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10747–10751.
- 77 Chen, R. (2001) Enzyme engineering: rational redesign versus directed evolution. *Trends Biotechnol.* **19**, 13–14.
- 78 Hancock, S. M., Vaughan, M. D. and Withers, S. G. (2006) Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 509–519.
- 79 Antikainen, N. M. and Martin, S. F. (2005) Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 2701–2716.
- 80 Voigt, C. A., Kauffman, S. and Wang, Z.-G. (2001) Rational evolutionary design: The theory of *in vitro* protein evolution. In *Advances in Protein Chemistry* (Frances H. Arnold, ed.), pp 79–160, Academic Press.
- 81 Ulmer, K. M. (1983) Protein engineering. *Science* **219**, 666–671.
- 82 Williams, G. J., Zhang, C. and Thorson, J. S. (2007) Expanding the promiscuity of a natural-product glycosyltransferase by directed evolution. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 657–662.
- 83 Williams, G. J., Goff, R. D., Zhang, C. and Thorson, J. S. (2008) Optimizing glycosyltransferase specificity via “hot spot” saturation mutagenesis presents a catalyst for novobiocin glycorandomization. *Chem. Biol.* **15**, 393–401.
- 84 Patenaude, S. I., Seto, N. O. L., Borisova, S. N., Szpacenko, A., Marcus, S. L., Palcic, M. M. and Evans, S. V. (2002) The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 685–690.
- 85 Persson, M., Letts, J. A., Hosseini-Maaf, B., Borisova, S. N., Palcic, M. M., Evans, S. V. and Olsson, M. L. (2007) Structural effects of naturally occurring human blood group B galactosyltransferase mutations adjacent to the DXD motif. *J. Biol. Chem.* **282**, 9564–9570.
- 86 Walsh, C., Freel Meyers, C. L. and Losey, H. C. (2003) Antibiotic glycosyltransferases: antibiotic maturation and prospects for reprogramming. *J. Med. Chem.* **46**, 3425–3436.
- 87 Truman, A. W., Dias, M. V. B., Wu, S., Blundell, T. L., Huang, F. and Spencer, J. B. (2009) Chimeric glycosyltransferases for the generation of hybrid glycopeptides. *Chem. Biol.* **16**, 676–685.
- 88 Hansen, E. H., Osmani, S. A., Kristensen, C., Møller, B. L. and Hansen, J. (2009) Substrate specificities of family 1 UGTs gained by domain swapping. *Phytochemistry* **70**, 473–482.
- 89 Krauth, C., Fedoryshyn, M., Schleberger, C., Luzhetskyy, A. and Bechthold, A. (2009) Engineering a function into a glycosyltransferase. *Chem. Biol.* **16**, 28–35.
- 90 Cartwright, A. M., Lim, E.-K., Kleanthous, C. and Bowles, D. J. (2008) A kinetic analysis of regiospecific glucosylation by two glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*: domain swapping to introduce new activities. *J. Biol. Chem.* **283**, 15724–15731.
- 91 Park, S.-H., Park, H.-Y., Sohng, J. K., Lee, H. C., Liou, K., Yoon, Y. J. and Kim, B.-G. (2009) Expanding substrate specificity of GT-B fold glycosyltransferase via domain swapping and high-throughput screening. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 988–994.

-
- 92 Park, S.-H., Park, H.-Y., Cho, B.-K., Yang, Y.-H., Sohng, J. K., Lee, H. C., Liou, K. and Kim, B.-G. (2009) Reconstitution of antibiotics glycosylation by domain exchanged chimeric glycosyltransferase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **60**, 29–35.
- 93 Kim, H.-L., Kim, A. H., Park, M. B., Lee, S.-W. and Park, Y. S. (2013) Altered sugar donor specificity and catalytic activity of pteridine glycosyltransferases by domain swapping or site-directed mutagenesis. *BMB Rep.* **46**, 37–40.
- 94 Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Bélanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., et al. (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**, 255–269.
- 95 Ostermeier, M., Nixon, A. E. and Benkovic, S. J. (1999) Incremental truncation as a strategy in the engineering of novel biocatalysts. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2139–2144.
- 96 Ostermeier, M., Shim, J. H. and Benkovic, S. J. (1999) A combinatorial approach to hybrid enzymes independent of DNA homology. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1205–1209.
- 97 Cobb, R. E., Chao, R. and Zhao, H. (2013) Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE J.* **59**, 1432–1440.
- 98 Crameri, A., Raillard, S. A., Bermudez, E. and Stemmer, W. P. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**, 288–291.
- 99 Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. and Arnold, F. H. (1998) Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination. *Nat. Biotechnol.* **16**, 258–261.
- 100 Ostermeier, M., Nixon, A. E., Shim, J. H. and Benkovic, S. J. (1999) Combinatorial protein engineering by incremental truncation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3562–3567.
- 101 Lutz, S., Ostermeier, M. and Benkovic, S. J. (2001) Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using α -phosphothioate nucleotides. *Nucleic Acids Res.* **29**, e16–e16.
- 102 Ostermeier, M. (2003) Theoretical distribution of truncation lengths in incremental truncation libraries. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 564–577.
- 103 Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R. K. (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7351–7367.
- 104 Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.
- 105 Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61–68.
- 106 Arend, J., Warzecha, H. and Stöckigt, J. (2000) Hydroquinone: O-glucosyltransferase from cultivated *Rauvolfia* cells: enrichment and partial amino acid sequences. *Phytochemistry* **53**, 187–193.
-

- 107 Arend, J., Warzecha, H., Hefner, T. and Stöckigt, J. (2001) Utilizing genetically engineered bacteria to produce plant-specific glucosides. *Biotechnol. Bioeng.* **76**, 126–131.
- 108 Hefner, T., Arend, J., Warzecha, H., Siems, K. and Stöckigt, J. (2002) Arbutin synthase, a novel member of the NRD1beta glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1731–1741.
- 109 Hefner, T. and Stöckigt, J. (2003) Probing suggested catalytic domains of glycosyltransferases by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem. FEBS* **270**, 533–538.
- 110 Vogt, T. and Taylor, L. P. (1995) Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant Physiol.* **108**, 903–11.
- 111 Miller, K. D., Strommer, J. and Taylor, L. P. (2002) Conservation in divergent solanaceous species of the unique gene structure and enzyme activity of a gametophytically-expressed flavonol 3-O-galactosyltransferase. *Plant Mol. Biol.* **48**, 233–242.
- 112 Miller, K. D., Guyon, V., Evans, J. N., Shuttleworth, W. A. and Taylor, L. P. (1999) Purification, cloning, and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-O-galactosyltransferase expressed in the male gametophyte of *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **274**, 34011–34019.
- 113 Palcic, M. M. and Sujino, K. (2001) Assays for glycosyltransferases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **13**, 361–370.
- 114 Wagner, G. K. and Pesnot, T. (2010) Glycosyltransferases and their assays. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **11**, 1939–1949.
- 115 Deng, C. and Chen, R. R. (2004) A pH-sensitive assay for galactosyltransferase. *Anal. Biochem.* **330**, 219–226.
- 116 Persson, M. and Palcic, M. M. (2008) A high-throughput pH indicator assay for screening glycosyltransferase saturation mutagenesis libraries. *Anal. Biochem.* **378**, 1–7.
- 117 Tawfik, D. S. (2004) Directed enzyme evolution: Screening and selection methods. *Methods in molecular biology* Vol. 230 edited by Frances H. Arnold and George Georgiou. 2003. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **13**, 2836–2837.
- 118 Hayashi, Y., Horibata, Y., Sakaguchi, K., Okino, N. and Ito, M. (2005) A sensitive and reproducible assay to measure the activity of glucosylceramide synthase and lactosylceramide synthase using HPLC and fluorescent substrates. *Anal. Biochem.* **345**, 181–186.
- 119 Aharoni, A., Thieme, K., Chiu, C. P. C., Buchini, S., Lairson, L. L., Chen, H., Strynadka, N. C. J., Wakarchuk, W. W. and Withers, S. G. (2006) High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat. Methods* **3**, 609–614.
- 120 Yang, G., Rich, J. R., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Feng, Y. and Withers, S. G. (2010) Fluorescence activated cell sorting as a general ultra-high-throughput screening

- method for directed evolution of glycosyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10570–10577.
- 121 Li, J.-J. and Bugg, T. D. H. (2004) A fluorescent analogue of UDP-N-acetylglucosamine: application for FRET assay of peptidoglycan translocase II (MurG). *Chem. Commun.* 182–183.
- 122 Maeda, T. and Nishimura, S.-I. (2008) FRET-based direct and continuous monitoring of human fucosyltransferases activity: an efficient synthesis of versatile GDP-L-fucose derivatives from abundant D-galactose. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **14**, 478–487.
- 123 Washiya, K., Furuike, T., Nakajima, F., Lee, Y. C. and Nishimura, S. I. (2000) Design of fluorogenic substrates for continuous assay of sialyltransferase by resonance energy transfer. *Anal. Biochem.* **283**, 39–48.
- 124 Yang, M., Brazier, M., Edwards, R. and Davis, B. G. (2005) High-throughput mass-spectrometry monitoring for multisubstrate enzymes: Determining the kinetic parameters and catalytic activities of glycosyltransferases. *ChemBioChem* **6**, 346–357.
- 125 Norris, A. J., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. and Toyokuni, T. (2001) Analysis of enzyme kinetics using electrospray ionization mass spectrometry and multiple reaction monitoring: fucosyltransferase V. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 3774–3779.
- 126 Nagahori, N. and Nishimura, S.-I. (2006) Direct and efficient monitoring of glycosyltransferase reactions on gold colloidal nanoparticles by using mass spectrometry. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **12**, 6478–6485.
- 127 Hood, C. M., Kelly, V. A., Bird, M. I. and Britten, C. J. (1998) Measurement of alpha(1-3) fucosyltransferase activity using scintillation proximity. *Anal. Biochem.* **255**, 8–12.
- 128 Miyashiro, M., Furuya, S. and Sugita, T. (2005) A high-throughput screening system for alpha1-3 fucosyltransferase-VII inhibitor utilizing scintillation proximity assay. *Anal. Biochem.* **338**, 168–170.
- 129 Ahsen, O. von, Voigtmann, U., Klotz, M., Nifantiev, N., Schottelius, A., Ernst, A., Müller-Tiemann, B. and Parczyk, K. (2008) A miniaturized high-throughput screening assay for fucosyltransferase VII. *Anal. Biochem.* **372**, 96–105.
- 130 Lowery, R. G. and Kleman-Leyer, K. (2006) Transcreeper: screening enzymes involved in covalent regulation. *Expert Opin. Ther. Targets* **10**, 179–190.
- 131 Wongkongkatap, J., Miyahara, Y., Ojida, A. and Hamachi, I. (2006) Label-free, real-time glycosyltransferase assay based on a fluorescent artificial chemosensor. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **45**, 665–668.
- 132 Ryu, J., Eom, M. S., Ko, W., Han, M. S. and Lee, H. S. (2014) A fluorescence-based glycosyltransferase assay for high-throughput screening. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 2571–2575.
- 133 Wu, Z. L., Ethen, C. M., Prather, B., Machacek, M. and Jiang, W. (2011) Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay. *Glycobiology* **21**, 727–733.
- 134 Zegzouti, H., Engel, L., Hennek, J., Vidugiris, G. and Goueli, S. (2013) Detection of glycosyltransferase activities with homogeneous bioluminescent UDP detection assay. *Glycobiology* **23**, 1340.

- 135 Shen, R., Wang, S., Ma, X., Xian, J., Li, J., Zhang, L. and Wang, P. (2010) An easy colorimetric assay for glycosyltransferases. *Biochem. Biokhimiia* **75**, 944–950.
- 136 Hubl, U., Slim, G. C. and Zubkova, O. V. (2000) Thin-layer chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis-based assays for sialyltransferases using tetramethylrhodamine-labeled acceptors. *Anal. Biochem.* **285**, 92–99.
- 137 Kopp, M., Rupprath, C., Irschik, H., Bechthold, A., Elling, L. and Müller, R. (2007) SorF: a glycosyltransferase with promiscuous donor substrate specificity *in vitro*. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **8**, 813–819.
- 138 Williams, G. J., Gantt, R. W. and Thorson, J. S. (2008) The impact of enzyme engineering upon natural product glycodiversification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 556–564.
- 139 Ahmed, A., Peters, N. R., Fitzgerald, M. K., Watson, James A., Hoffmann, F. M. and Thorson, J. S. (2006) Colchicine glycorandomization influences cytotoxicity and mechanism of action. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 14224–14225.
- 140 Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R. and Azeredo, J. (2014) Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 281–299.
- 141 Li, D., Park, S.-H., Shim, J.-H., Lee, H.-S., Tang, S.-Y., Park, C.-S. and Park, K.-H. (2004) *In vitro* enzymatic modification of puerarin to puerarin glycosides by maltogenic amylase. *Carbohydr. Res.* **339**, 2789–2797.
- 142 Li, D., Roh, S.-A., Shim, J.-H., Mikami, B., Baik, M.-Y., Park, C.-S. and Park, K.-H. (2005) Glycosylation of genistin into soluble inclusion complex form of cyclic glucans by enzymatic modification. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6516–6524.
- 143 Büttner, M. and Barleben, L. (2012) One-pot fusion polymerase chain reaction for combinatorial synthesis of DNA from several cassettes. *Anal. Biochem.* **421**, 797–798.
- 144 Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
- 145 Tartof, K. D. and Hobbs, C. A. (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Focus* **9**, 12.
- 146 Sambrook, J. and Russell, D. D. W. (2006) *The Condensed Protocols: From "Molecular Cloning : a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 147 Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.
- 148 Hoppe, B. L., Conti-Tronconi, B. M. and Horton, R. M. (1992) Gel-loading dyes compatible with PCR. *BioTechniques* **12**, 679–680.
- 149 Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 150 Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. and Silverman, G. J. (2007) Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2007**, pdb.ip47.
- 151 Wilfinger, W. W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474–476, 478–481.

- 152 Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159–162.
- 153 Böttger, E. C. (1988) High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electrotransformation. *BioTechniques* **6**, 878–880.
- 154 Dower, W. J., Miller, J. F. and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127–6145.
- 155 Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335–350.
- 156 Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- 157 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467.
- 158 Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881–10890.
- 159 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 160 Chrambach, A., Reisfeld, R. A., Wyckoff, M. and Zaccari, J. (1967) A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **20**, 150–154.
- 161 Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255–262.
- 162 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- 163 Ozaki, E., Sakimae, A. and Numazawa, R. (1994) Cloning and expression of *Pseudomonas putida* esterase gene in *Escherichia coli* and its use in enzymatic production of d- β -acetylthioisobutyric acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1745–1746.
- 164 Schultheiss, E., Weiss, S., Winterer, E., Maas, R., Heinzle, E. and Jose, J. (2008) Esterase autodisplay: Enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4782–4791.
- 165 Morís-Varas, F., Shah, A., Aikens, J., Nadkarni, N. P., Rozzell, J. D. and Demirjian, D. C. (1999) Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2183–2188.
- 166 Yao, Y., Wang, M. H., Zhao, K. Y. and Wang, C. C. (1998) Assay for enzyme activity by following the absorbance change of pH-indicators. *J. Biochem. Biophys. Methods* **36**, 119–130.

- 167 Chen, H., Yao, J., Wang, Y., Tian, L., Wang, F., Djak, A., Choi, M. M. F. and Bramanti, E. (2007) A microcalorimetric method for studying the toxic effect of different diphenol species on the growth of *Escherichia coli*. J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. **42**, 613–620.
- 168 Bader, R.-E. and Hotz, G. (1951) Eisen-Harnstoff-Agar, eine Modifikation des Eisen-Agars nach Kligler. Z. Für Hyg. Infekt. **133**, 20–25.
- 169 Kligler, I. J. (1917) A simple medium for the differentiation of members of the thyphoid-paratyphoid group. Am. J. Public Health N. Y. N 1912 **7**, 1042–1044.
- 170 Christensen, W. B. (1946) Urea decomposition as a means of differentiating proteus and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types 1. J. Bacteriol. **52**, 461–466.
- 171 Simmons, J. S. (1926) A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi with colored plate. J. Infect. Dis. **39**, 209–214.
- 172 Kim, G.-E., Lee, J.-H., Jung, S.-H., Seo, E.-S., Jin, S.-D., Kim, G. J., Cha, J., Kim, E.-J., Park, K.-D. and Kim, D. (2010) Enzymatic synthesis and characterization of hydroquinone galactoside using *Kluyveromyces lactis* lactase. J. Agric. Food Chem. **58**, 9492–9497.
- 173 Seo, E.-S., Kang, J., Lee, J.-H., Kim, G.-E., Kim, G. J. and Kim, D. (2009) Synthesis and characterization of hydroquinone glucoside using *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. Enzyme Microb. Technol. **45**, 355–360.
- 174 McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. and Lopez, R. (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. Nucleic Acids Res. **41**, W597–W600.
- 175 Hoheisel, J. D. (1993) On the activities of *Escherichia coli* exonuclease III. Anal. Biochem. **209**, 238–246.

ANHANG

(a) cDNA der verwendeten Kämpferol-3-*O*-Galactosyltransferase (1.356 bp)

5'-ATGAGCAATTATCATGTTGCCGTTCTGGCATTTCGGTTTGCAACCCATGCAGGTCTGCTGCTGGGTCTGGTT
CAGCGTCTGGCAAATGCACTGCCGAATGTTACCTTTACCTTTTTCAATACCAGCAAAAGCAACAGCAGCCTGTT
TACCACACCGCATGATAATAACATCAAACCGTTTAACATTAGTGATGGTGTGCCGGAAGGTTATGTTGTTGGTA
AAGGTGGCATTGAAGCACTGATTGGTCTGTTTTTCAAAGCGCCAAAGAAAACATTCAGAATGCAATGGCAGC
AGCAGTTGAAGAAAGCGGCAAAAAAATCACCTGTGTTATGGCAGATGCCTTTATGTGGTTTAGCGGTGAAATT
GCAGAAGAACTGAGCGTTGGTTGGATTCCGCTGTGGACCAGCGCAGCAGGTAGCCTGAGCGTTCATGTTTATA
CCGATCTGATTCTGTAAAATGTTGAAGCACAGGGTATTGCAGGTCGTGAAGATGAAATTCTGACCTTTATTCCG
GGTTTTGCAGAACTGCGTCTGGGTAGCCTGCCGAGCGGTGTTGTGAGCGGTGATCTGGAAAGCCCCTTTAGC
GTTATGCTGCATAAAATGGGTAAAACCATTTGGTAAAGCAACCGCACTGCCGGTTAATAGCTTTGAAGAACTGG
ACCCTCCGATTGTTGAAGATCTGAAAAGCAAATTCAACAACCTTTCTGAACGTGGGTCCGTTTAATCTGACAACC
CCGCCTCTAGTGCCAATATCACCGACGAGTATGGCTGTATCGCTGGCTGGACAAACAAGAACCGGGTAGCG
TTGCTTATATCGGATTTGGGACAGTTGCCACACCTCCGCCTAATGAGCTGAAAGCAATGGCAGAAGCCCTGGA
AGAATCCAAAACGCCGTTCTGTGGTCACTGAAAGACCTGTTCAAAAGTTTTTTCCCGGAAGGTTTTCTGGAGC
GTACCAGCGAATATGGTAAAATCGTGTCTGGGCACCTCAAGTTCAAGTTCTGAGCCACGGTAGTGTGCGAGT
GTTTATCAACCACTGTGGGTGGAATTCTGTACTGGAGTCAATTGCCGCCGGTGTACCGGTCATTTGCCGTCCTT
TTTTCGGGGATCACCAGCTGAATGCCTGGATGGTGGAGAAAGTCTGGAAAATTGGCGTGAAAATTGAAGGTG
GCGTGTTACCAAAGATGGAACCATGCTGGCCCTGGATCTGGTCCTGAGCAAAGACAAACGTAATACCGAACT
GAAACAGCAGATTGGGATGTATAAAGAACTGGCGCTGAACGCTGTTGGACCTTCTGGTAGCAGTGCCGAGAA
TTTCAAAAACTGGTGGACATCATCACCTCTTGTAATAA-3'

(b) cDNA von *ASGalT_Bib* (1.440 bp)

5'-ATGGAGCATACACCTCACATTGCTATGGTGCCCACTCCGGGAATGGGTCATCTGATCCCCCTCGTTGAGTT
CGCTAAACGACTCGTCTCCGTCACAACTTTGGCGTCACTTTTATTATCCCAACCGATGGACCTCTCCCTAAAGC
ACAGAAGAGTTTTCTTGATGCTCTTCCCGCCGGCGTAAACTATGTTCTTCTTCCCCCGGTAAGCTTCGACGACTT
ACCCGCTGATGTTAGGATAGAGACCCGATTTGTCTCACCATCACTCGCTCTCTCCCGTTTGTTGGGGATGCCGT
TAAGACTCTACTCGCCACCACCAAGTTAGCTGCTCTAGTGGTGGATCTTTTCGGCACCGATGCATTTGATGTTG
CAATTGAGTTCAAGGTCTCCCTTATATCTTCTATCCTACGACGGCCATGTGCCTGTCTTTTTCTTTCACTTGCC
TAAGCTTGATCAAATGGTGTCTGCGAATATAGAGACGTCCCAGAACCATTGCAGATTCCAGGATGCATACCC
ATTCACGGGAAGGATTTCTTGACCCAGCTCAGGATCGCAAAAATGATGCCTACAAATGCCTCCTCACCAGGC
CAAGAGATACCGGTTAGCTGAGGGTATCATGGTCAACACCTTCAACGACTTGAGCCAGGACCTTAAAAGCT
TTGCAGGAGGAAGACCAGGGTAAGCCACCCGTTTATCCGATCGGACCACTCATCAGAGCGGATTCAAGCAGC
AAGGTGCAGGACTGTGAATGTTTGAAATGGCTAGATGACCAGCCACGTGGGCTCGAGGGTCCGTTTAATCTGA
CAACCCCGCTCTAGTGCCAATATCACCGACGAGTATGGCTGTATCGCTGGCTGGACAAACAAGAACCCGGG
TAGCGTTGCTTATATCGGATTTGGGACAGTTGCCACACCTCCGCCTAATGAGCTGAAAGCAATGGCAGAAGCC
CTGGAAGAATCCAAAACGCCGTTCTGTGGTCACTGAAAGACCTGTTCAAAAGTTTTTTCCCGGAAGGTTTTCT
GGAGCGTACCAGCGAATATGGTAAAATCGTGTCTGGGCACCTCAAGTTCAAGTTCTGAGCCACGGTAGTGTG
GGAGTGTTTATCAACCACTGTGGGTGGAATTCTGTACTGGAGTCAATTGCCGCCGGTGTACCGGTCATTTGCC
GTCCTTTTTTTCGGGGATCACCAGCTGAATGCCTGGATGGTGGAGAAAGTCTGGAAAATTGGCGTGAAAATTGA
AGGTGGCGTGTTACCAAAGATGGAACCATGCTGGCCCTGGATCTGGTCCTGAGCAAAGACAAACGTAATACC
GAACTGAAACAGCAGATTGGGATGTATAAAGAACTGGCGCTGAACGCTGTTGGACCTTCTGGTAGCAGTGCC
GAGAATTTCAAAAACTGGTGGACATCATCACCTCTTGTAATAA-3'